



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**PRODUKCE VYBRANÝCH METABOLITŮ POMOCÍ
KVASINEK A ŘAS KULTIVOVANÝCH VE STRESOVÝCH
PODMÍNKÁCH**

PRODUCTION OF SELECTED METABOLITES BY YEASTS AND ALGAE CULTIVATED UNDER STRESS
CONDITIONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Veronika Mariničová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1308/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Veronika Mariničová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název diplomové práce:

Produkce vybraných metabolitů pomocí kvasinek a řas kultivovaných ve stresových podmínkách

Zadání diplomové práce:

Cílem práce je srovnání produkce vybraných metabolitů kvasinkami a řasami kultivovanými v podmínkách externího stresu.

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) literární rešerše zaměřená na druhy a produkci lipidických metabolitů pomocí kvasinek a řas
- 2) kultivace vybraných druhů karotenogenních kvasinek a řas v podmínkách externího stresu (osmotický, světelný, teplotní)
- 3) stanovení růstových a produkčních vlastností kvasinek a řas ve stresových podmínkách
- 4) vyhodnocení vlivu stresu na produkci biomasy, karotenoidů, lipidů a dalších metabolitů.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Veronika Mariničová
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená práce se věnovala především srovnání produkce vybraných metabolitů pomocí karotenogenních kvasinek a mikrořas kultivovaných v podmínkách externího stresu. Mezi hlavní sledované metabolity patřily karotenoidy, dále další lipofilní látky a lipidy. Biotechnologická nadprodukce těchto metabolitů by mohla sloužit jako zdroj potenciálně prospěšných látek nejen pro farmaceutický, kosmetický a potravinářský průmysl, ale rovněž pro produkci biopaliv třetí generace. V poslední době se zvyšuje zájem o biopaliva především z mikrořas, které mají vysoký potenciál v produkci biopaliv, které se zdají být nadějným zdrojem.

Teoretická část se zabývá popisem jednotlivých rodů karotenogenních kvasinek, mikrořas, sinic, chemickým složením produkovaných metabolitů a stručnou biosyntézou. Dále byly popsány jednotlivé metody, které sloužily pro analýzu produkce sledovaných metabolitů.

Experimentální část je zaměřena na srovnání produkce karotenoidů, koenzymu Q, ergosterolů (fytoosterolů) a lipidů pomocí kvasinek, mikrořas a sinic. Jako zdroj externího stresu byl zvolen teplotní, solný a světelný stres. Z kvasinkových kmenů byly prostudovány kmeny *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporidiobolus pararoseus* a *Cystofilobasidium macerans*. V případě mikrořas a sinic se jednalo o kmen *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus dimorphus*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella saccharophila*, *Botryococcus brauni*, *Synechococcus nidulans* a *Arthrospira maxima*. U kvasinkových a řasových kmenů bylo stanoveno optimum pro růst, produkci karotenoidů a lipidů. Aplikovaný solný stres vykazoval výrazný likvidační efekt na řasové a sinicové kmeny. V rámci diplomové práce byl rovněž sledován stres biologický, tzv. ko-kultivace mikrořas a kvasinek. Další experimenty budou předmětem navazujících prací.

KLÍČOVÁ SLOVA

Karotenogenní kvasinky, mikrořasy, sinice, karotenoidy, lipidy, HPLC/PDA, GC/FID, stresové podmínky

ABSTRACT

The presented work was focused on the comparison between the production of selected metabolites by carotenogenic yeasts and microalgae cultivated under conditions of external stress. The main metabolites of interest were carotenoids, further lipophilic substances and lipids. Biotechnological overproduction of these metabolites could serve as a source of potentially beneficial substances not only for the pharmaceutical, cosmetic and food industries, but also for the production of third generation biofuels. Recently, there has been a growing interest in biofuels primarily from microalgae, which have a high potential in biofuel production and seem to be a promising source.

The theoretical part deals with the description of individual genera of carotenogenic yeasts, microalgae, cyanobacteria, chemical composition of produced metabolites and brief biosynthesis. In addition, individual methods for analyzing the production of the metabolites of interest were described.

The experimental part is focused on the comparison of production of carotenoids, coenzyme Q, ergosterols (phytosterols) and lipids by yeasts, microalgae and cyanobacteria. As a source of external stress, temperature, salt and light stress were chosen. The strains of *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporidiobolus pararoseus* and *Cystofilobasidium macerans* were studied from the yeast strains. Microalgae and cyanobacteria were *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus dimorphus*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella saccharophila*, *Botryococcus brauni*, *Synechococcus nidulans* and *Arthrospira maxima*. The yeast and algal strains were optimized for growth, carotenoid and lipid production. Applied salt stress showed a significant liquidation effect on algal and cyanobacterial strains. The thesis also monitored the biological stress, so-called co-cultivation of microalgae and yeasts. Further experiments will be the subject of future work.

KEYWORDS

Carotenogenic yeast, microalgae, cyanobacteria, carotenoids, lipids, HPLC/PDA, GC/FID, stress conditions

MARINIČOVÁ, Veronika. *Produkce vybraných metabolitů pomocí kvasinek a řas kultivovaných ve stresových podmínkách*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115839>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Ivana Márová.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce paní prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za odborné vedení práce, cenné rady a čas, který mi věnovala. Dále poděkování patří konzultantovi Ing. Martinu Szotkowskému za odborné rady, velkou ochotu, trpělivost při zpracování mojí experimentální části. Nakonec chci poděkovat také své rodině a přátelům za podporu během mého studia.

OBSAH

| | |
|--|----|
| ABSTRAKT | 3 |
| KLÍČOVÁ SLOVA..... | 3 |
| ABSTRACT | 4 |
| KEYWORDS | 4 |
| 1 ÚVOD..... | 8 |
| 2.1 KVASINKY | 9 |
| 2.1.1 <i>Karotenogenní kvasinky</i> | 9 |
| 2.2 ŘASY | 11 |
| 2.2.1 <i>Rod Botryococcus</i> | 11 |
| 2.2.2 <i>Rod Chlorella</i> | 12 |
| 2.2.3 <i>Rod Scenedesmus</i> | 13 |
| 2.3 SINICE (CYANOBAKTERIE) | 13 |
| 2.3.1 <i>Rod Synechococcus</i> | 14 |
| 2.3.2 <i>Rod Arthrospira</i> | 14 |
| 2.4 METABOLITY PRODUKOVANÉ KVASINKAMI A ŘASAMI | 15 |
| 2.4.1 <i>Karotenoidy</i> | 15 |
| 2.4.2 <i>Biosyntéza isoprenoidů</i> | 17 |
| 2.4.3 <i>Ergosterol</i> | 18 |
| 2.4.4 <i>Koenzym Q₁₀</i> | 18 |
| 2.4.5 <i>Chlorofyly</i> | 19 |
| 2.4.6 <i>Biosyntéza chlorofylu</i> | 19 |
| 2.4.7 <i>Lipidy</i> | 21 |
| 2.4.8 <i>Biosyntéza vyšších mastných kyselin</i> | 22 |
| 2.5 VLIV VNĚJŠÍCH FAKTORŮ NA MIKROORGANISMY..... | 23 |
| 2.5.1 <i>Biologické faktory</i> | 24 |
| 2.5.2 <i>Fyzikální a chemické faktory</i> | 24 |
| 2.6 METODY ZPRACOVÁNÍ BUNĚK A JEJICH METABOLITŮ..... | 26 |
| 2.6.1 <i>Extrakce</i> | 26 |
| 2.6.2 <i>Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti</i> | 26 |
| 2.6.3 <i>Chromatografické metody</i> | 27 |
| 3 CÍL PRÁCE | 31 |
| 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 32 |
| 4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE | 32 |
| 4.1.1 <i>Chemikálie použité pro kultivaci kvasinek</i> | 32 |
| 4.1.2 <i>Chemikálie použité pro kultivaci sinic a mikrořas</i> | 32 |
| 4.1.3 <i>Chemikálie použité pro extrakce</i> | 32 |
| 4.1.4 <i>Chemikálie použité pro transesterifikaci a analýzu pro GC a pro HPLC</i> | 32 |
| 4.2 PŘÍSTROJE A POMŮCKY PRO KULTIVACE | 32 |
| 4.3 PŘÍSTROJE POUŽÍVANÉ PRO IZOLACI A ANALÝZU VYBRANÝCH METABOLITŮ..... | 33 |
| 4.4 POUŽITÉ KMENY MIKROORGANISMŮ..... | 33 |
| 4.4.1 <i>Kmeny kvasinek</i> | 33 |
| 4.4.2 <i>Kmeny mikrořas</i> | 33 |
| 4.4.3 <i>Kmeny sinic</i> | 34 |
| 4.5 KULTIVACE MIKROORGANISMŮ..... | 34 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.5.1 | Kultivace karotenogenních kvasinek | 34 |
| 4.5.2 | Kultivace mikrořas a sinic | 35 |
| 4.5.3 | Ko-kultivace | 37 |
| 4.5.4 | Stanovení nárůstu biomasy a následné zpracování pro analýzy | 37 |
| 4.6 | IZOLACE A ANALÝZA KAROTENOIDŮ A DALŠÍCH LIPIDICKÝCH LÁTEK | 38 |
| 4.6.1 | Izolace karotenoidů a dalších lipidických metabolitů | 38 |
| 4.6.2 | Analýza karotenoidů a dalších lipidických metabolitů pomocí HPLC | 38 |
| 4.6.3 | Transesterifikace vzorku mikrobiální biomasy | 39 |
| 4.6.4 | Analýza lipidů pomocí GC | 39 |
| 5 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 41 |
| 5.1 | KVASINKY | 41 |
| 5.1.1 | Kmen <i>Rhodotorula glutinis</i> | 41 |
| 5.1.2 | Kmen <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | 48 |
| 5.1.3 | Kmen <i>Cystofilobasidium macerans</i> | 54 |
| 5.1.4 | Kmen <i>Sporidiobolus pararoseus</i> | 60 |
| 5.2 | ŘASY A SINICE | 67 |
| 5.2.1 | Kmen <i>Scenedesmus dimorphus</i> | 67 |
| 5.2.2 | Kmen <i>Scenedesmus obliquus</i> | 70 |
| 5.2.3 | Kmen <i>Chlorella saccharophila</i> | 73 |
| 5.2.4 | Kmen <i>Chlorella sorokiniana</i> | 76 |
| 5.2.5 | Kmen <i>Arthrospira maxima</i> | 80 |
| 5.2.6 | Kmen <i>Botryococcus brauni</i> | 83 |
| 5.2.7 | Kmen <i>Synechococcus nidulans</i> | 86 |
| 5.3 | BIOLOGICKÉ STRESY – KO-KULTIVACE KVASINEK A ŘAS | 89 |
| 7 | SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ | 93 |
| 8 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ | 100 |
| 9 | PŘÍLOHY | 101 |

1 ÚVOD

V současné době dochází ke zvýšenému zájmu o biotechnologické produkce karotenoidů, lipofilních metabolitů a lipidů pomocí kvasinek, bakterií, hub a mikrořas. Vzhledem ke skutečnosti, že postupně narůstá populace a vyčerpávají se energetické zdroje, tak mikroorganismy představují alternativní cestu, kde biomasu lze využít jako zdroj obnovitelné energie. Metabolismus některých mikroorganismů je možné aplikovat pro syntézu různých prospěšných látek, kde jako zdroj energie může být odpadní substrát, který by již neměl další využití. Karotenoidy, produkované zejména karotenogenními kvasinkami a mikrořasami, jsou velmi cennými chemickými molekulami, které se využívají v různých průmyslových odvětvích, jako jsou farmaceutický, potravinářský a kosmetický průmysl. Jejich funkce je nejenom, že slouží jako prekurzory vitamínu A, ale vykazují silnou antioxidační aktivitu. Karotenoidy hrají důležitou roli v lidském organismu a při jejich dlouhodobém užívání jsou asociovány s prevencí proti kardiovaskulárním, neurologickým onemocněním a rakovině.

V této době se karotenoidy vyrábí hlavně chemickou syntézou nebo extrakcí z rostlinných zdrojů, které jsou závislé na environmentálních podmínkách, a nelze to příliš vhodně regulovat. Díky tomu roste zájem o mikrobiální karotenoidy produkované pomocí karotenogenních kvasinek a mikrořas, které za určitých podmínek jsou schopny akumulovat vysoké množství těchto zdraví prospěšných látek, jejich produkce je kontrolovatelná a postupně ji lze optimalizovat.

Lipidy mají v organismech důležitou funkci, kde slouží především jako zdroj a zásoba energie a jsou rozpouštědlem pro lipofilní vitaminy. V této době z hlediska výživy stoupá zájem o polynenasycené mastné kyseliny, především ω -3. Jejich příjem ve stravě je klíčový, neboť hrají důležitou roli v prevenci a léčbě v celé řadě kardiovaskulárních onemocnění. Mikrořasy jsou schopny za určitých podmínek produkovat tyto vysoce cenné polynenasycené mastné kyseliny a mnoho dalších prospěšných látek. V potravinových doplncích se setkáváme s využitím především mikrořasy *Chlorella vulgaris* a sinice *Arthrospira maxima*, známé jako Spirulina.

Další využití lipidů je pro biopaliva tzv. třetí generace. Poptávka po palivech na bázi ropy v posledních letech rapidně vzrostla a ropné zdroje jsou omezené, neobnovitelné, rovněž mají obrovský negativní efekt na změnu klimatu a přispívají ke globálnímu oteplování. Ačkoliv jsou biopaliva na bázi rostlinných olejů snadno dostupné, tak zasahují do potravinového řetězce. Díky tomu stoupá zájem o mikrobiální lipidy produkované hlavně pomocí mikrořas, které se zdají být slibným zdrojem mastných kyselin o podobném složení jako je tomu u biopaliv na bázi olejnin.

Diplomová práce se zabývá především srovnáním produkčních vlastností mikrořas a karotenogenních kvasinek kultivovaných ve stresových podmínkách. Byla sledována produkce jednotlivých metabolitů, především karotenoidů, dalších lipofilních metabolitů, lipidů a byla snaha o stanovení optima pro růst a produkce jednotlivých látek.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou eukaryotické chemoheterotrofní jednobuněčné houby, které jsou široce rozšířené v přírodě na celé planetě. Je známo přibližně 1500 druhů kvasinek patřících do více než 100 rodů, nicméně odhaduje se, že pouze 1 % kvasinek bylo doposud popsáno. Buňky kvasinek jsou velmi rozmanité. Některé tvary bývají charakteristické pro určité druhy, avšak většinou se jejich tvar mění podle vnějších podmínek nebo v průběhu vývojového stádia. Velikost buněk kvasinek se pohybuje v rozmezí od 3 do 15 μm [1, 2].

Jejich struktura je podobná jako u jiných eukaryotních buněk, rozdíl je především v přítomnosti pevné a silné buněčné stěny, která buňky ochraňuje před nepříznivými vlivy a udává ji tvar [3].

Pro růst a rozmnožování většiny druhů kvasinek se optimální teplota růstu pohybuje kolem 25 °C až 28 °C, avšak některé druhy rostou lépe při jiných teplotách. Většina druhů kvasinek se řadí mezi mezofilní, avšak existují také kvasinky psychofilní. Mezi psychofilní kvasinky můžeme zařadit například rod *Rhodotorula*, nicméně bylo zjištěno, že obsahují obdobnou zásobu aminokyselin při teplotě 5 °C a při 25 °C [4].

Pokud překročíme nejvyšší akceptovatelnou teplotu pro růst kvasinek, dochází především k poškození membrány nebo v menším množství dojde k inaktivaci enzymů. Schopnost odolávat vyšším teplotám je dána především termostabilitou vnitřních membrán. Hlavní složkou membrán, které hraje roli v adaptaci na teplotu, jsou nenasycené mastné kyseliny. Pokud se jedná o psychofilní druhy kvasinek, ty jsou významné pro vyšší obsah nenasycených mastných kyselin ve vnitřní membráně, avšak termofilní druhy se vyznačují přítomností nižších nenasycených a nasycených mastných kyselin [4].

Pro kvasinky je typický způsob rozmnožování vegetativně tzn. pučením, ale vedle vegetativního rozmnožování se kvasinky mohou množit také pravým pohlavním rozmnožováním. Při pučení buňky zůstávají na pólech spojené a vzniknou dlouhá protáhlá vlákna. Naopak u jiných rodů může docházet ke vzniku tzv. pravého mycelia, kde vlákno vzniká příčným dělením buňky. U pravého rozmnožování dochází ke splynutí dvou buněk a následnému vzniku zygoty, z níž dojde k tvorbě nových buněk [3, 5].

2.1.1 Karotenogenní kvasinky

Karotenogenní kvasinky řadící se do oddělení *Basidiomycetes*, jsou charakteristické schopností produkovat červené pigmenty a další lipidické látky. Tyto látky jsou nerozpustné ve vodním prostředí, proto nikdy neprostupují do živného média [6].

K syntéze těchto chemických sloučenin potřebují kvasinky v první řadě zdroj kyslíku a světla. Produkce karotenoidů v kvasinkách je stimulována především kyslíkem a reaktivními kyslíkovými sloučeninami. Mezi karotenoidy produkované kvasinkami patří především β -karoten, torulen a torularhodin. Obsahy jednotlivých druhů karotenoidů jsou závislé na kultivačních podmínkách a druhů kvasinek [6].

Kvasinky těmito pigmenty zabarvují své kultury do cihlově-červené, žluté nebo oranžové barvy. Do této skupiny můžeme zařadit například rody *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, *Cystofilobasidium*, *Xanthophyllomyces* a další [1, 6, 7].

2.1.1.1 Rod *Cystofilobasidium*

Rod *Cystofilobasidium* zařazujeme do čeledi *Cystofilobasidiaceae*. Na pevném agarovém médiu mají kolonie oranžové až růžové zabarvení, které při stárnutí postupně ztmavnou. U tohoto rodu jsou známy také nepigmentotvorné druhy kvasinek.

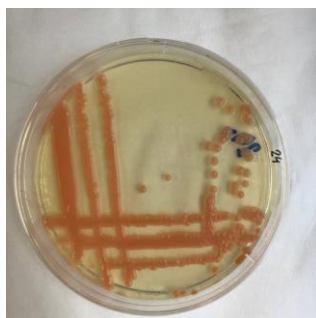
Mezi nejznámější druhy řadíme *Cystofilobasidium macerans*,
Cystofilobasidium infirmominium nebo *Cystofilobasidium bisporidii*.

Druh *Cystofilobasidium macerans* se vyznačuje velikostí buněk (1,0 až 5,0)×(2 až 14) µm. Z hlediska utilizací substrátu disponuje enzymatickým aparátem pro zpracování erythritolu [6, 7].

2.1.1.2 Rod *Rhodotorula*

Rod *Rhodotorula* se vyznačuje tvorbou malých buněk s rozměry (2,5 až 5,0)×(6 až 13) µm. V kapalném prostředí vytváří kultura sediment a prstenec světle krémové barvy. Pokud se jedná o kulturu na pevném živném médiu, závisí výsledná barva na složení média. U pevného média pozorujeme především kolonie korálově-červené, lososové až pomerančové barvy s hladkým a lesklým povrchem. Kvasinky rodu *Rhodotorula* lze izolovat především ze vzduchu, z povrchů rostlin a živočichů nebo z půdy. Z hlediska výživy nejsou náročné, jsou schopny růst také na půdě s nízkým obsahem dusíku. Mezi nejznámější zástupce zde můžeme zařadit druhy například *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* nebo *Rhodotorula graminis*. Jsou známy především jako producenti β-karotenu. Kromě β-karotenu jsou v kvasinkách identifikované další karotenoidy jako torulen, torularhodin a γ-karoten [6, 8].

Rod *Rhodotorula* patří mezi lipidotvorné mikroorganismy, které za určitých kultivačních podmínek mohou dosahovat velmi vysokých výtěžků lipidů. Jedná se především o nasycené nebo mononenasycené mastné kyseliny, kde se majoritně jedná o kyselinu olejovou nebo stearovou [6].



Obrázek 1. Křížový roztěr kultury *Rhodotorula mucilaginosa*

2.1.1.3 Rod *Sporidiobolus*

Rod *Sporidiobolus* patří do skupiny, které vytváří balistokonidie, které jsou na jednoduchých nebo rozvětvených sterigmách a na myceliu. Jsou zde přítomny druhy, které dokážou využít nitráty, jako například *Sporidiobolus johnsonii* a druhy neutilizující nitráty, jako *Sporidiobolus pararoseus* [6].

Druh *Sporidiobolus pararoseus* se vyznačuje rozmanitými tvary. Najdeme zde kulovité nebo elipsoidní buňky s rozměry (3 až 9)×(4 až 21) µm. V kapalném prostředí kultura ve větším množství sedimentuje. Na pevném agarovém médiu vytváří kolonie broskvové, lososové nebo korálově červené barvy [6].



Obrázek 2. Křížový roztěr kultury *Sporidiobolus pararoseus* [97]

2.2 Řasy

Řasy jsou velkou skupinou fotosyntetických organismů. Jedná se převážně o vodní organismy vyskytující se téměř po celé planetě. V biologii řasy patří do umělé nebo polyfyletické skupiny, která nemá žádného společného předchůdce pro všechny druhy řas. I když mezi rostlinami a řasami existuje silná morfologická podobnost, neboť produkují stejné zásobní látky, rostliny vykazují velmi vysoký stupeň diferenciaci. Každý druh řas je morfologicky odlišný v závislosti na životních podmínkách, jako množství slunečního světla, teplota prostředí, pH a množství živin ve vodě. Nicméně řasy mají několik společných rysů, jako existence převážně ve vodním prostředí, jednoduchá morfologie a schopnost provádět fotosyntézu. Různé druhy řas můžeme najít, jak ve slané vodě (*Chondrus crispus*), tak ve sladké vodě (*Cladophora rivularis*). Značný počet řas se přizpůsobil životu na Zemi, mohou se vyskytovat na kmenech stromů, na ledovcích dokonce v horkých pramenech. Řasy můžou vytvářet symbiotický vztah s jinými organismy, kupříkladu se jedná o symbiózu s houbami, kde tvoří lišejníky. Termín řasy se vztahuje, jak na makrořasy, tak i na vysoce diverzifikovanou skupinu mikrořas. Velikosti makrořas mohou dosahovat až 10 metrů, zatímco velikost mikrořas se pohybuje kolem 3 až 30 μm [9, 10, 11, 12, 13, 14, 15].

Na naší planetě existuje až 10 milionů druhů řas a většina z nich jsou mikrořasy. Mikrořasy jsou převážně fotosyntetické, zatímco pouze několik druhů je mixotrofních nebo heterotrofních. Hlavní požadavky pro jejich růst je zdroj světla, uhlík, makronutrienty jako dusík, fosfor, hořčík a silikáty a některé mikronutrienty, které jsou specifické pro určité druhy řas [10,14,16].

Pro autotrofní druhy řas je jako zdroj uhlíku potřebný oxid uhličitý, zatímco heterotrofní způsob výživy vyžaduje organický zdroj živin. Mixotrofní řasy mají schopnost využívat pro svůj metabolismus jak fotosyntézu, tak i exogenní organický zdroj živin [17].

Prokaryotické druhy řas lze rozdělit do dvou skupin: *Cyanophyta* a *Prochlorophyta*, zatímco eukaryotické druhy řadíme do skupin jako *Glaucomphyta*, *Heterophyta*, *Haptophyta*, *Dinophyta*, *Euglenophyta*, *Chlorophyta*, *Chlorarachniophyta*, *Cryptophyta* a *Rhodophyta* [14].

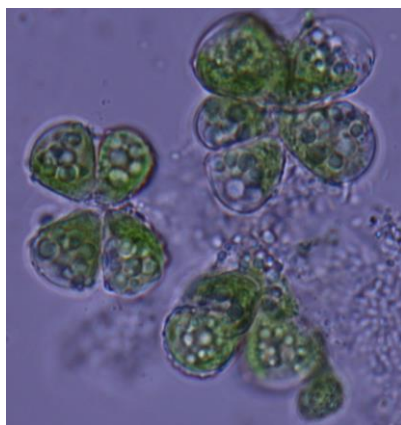
Dále lze řasy rozdělit podle druhu obsahu pigmentů. Zelené druhy řas obsahují chlorofyl A, chlorofyl B, β -karoten, lutein a zeaxanthin, hnědé druhy naopak syntetizují chlorofyl C, β -karoten, a červené řasy jsou typické pro obsah chlorofylu D, β -karotenu, zeaxanthinu, fykoerythrinu a fykocyaninu [15,18,19].

2.2.1 Rod *Botryococcus*

Rod *Botryococcus* patří do skupiny řas s velkým potenciálem pro využití tvorby energie na bázi mikroorganismů. Chemické složení této mikrořasy by mohlo být využito pro biopaliva, jako je bioethanol nebo bionafta. Nicméně hlavní nevýhodou řas rodu *Botryococcus* oproti ostatním mikrořasám je především pomalý růst [20, 21, 22].

Mezi hlavní zástupce patří druh *Botryococcus brauni*, který najdeme v koloniích rostoucích ve hvězdokupě a vyskytuje především mírných nebo tropických jezerech, nádržích nebo rybnících. Je téměř všudypřítomný, vyjma zón kolem Antarktidy. Velikost buněk se pohybuje na délku v rozmezí od 8 μm do 5 μm a na šířku od 13 μm do 9 μm . Tento druh se jeví jako jeden z nejslibnějších pro výrobu biopaliv, kde dosahuje vynikající produkce lipidů až 65 % sušiny. [22,23, 24, 25].

Experimenty prokázaly, že optimální podmínky pro růst druhu *Botryococcus brauni* je teplota 23 °C, intenzita osvětlení 274 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu dvanácti hodin za den a salinita 0,15 mol/l chloridu sodného [26].



Obrázek 3. Mikroskopický snímek kmenu *Botryococcus brauni*

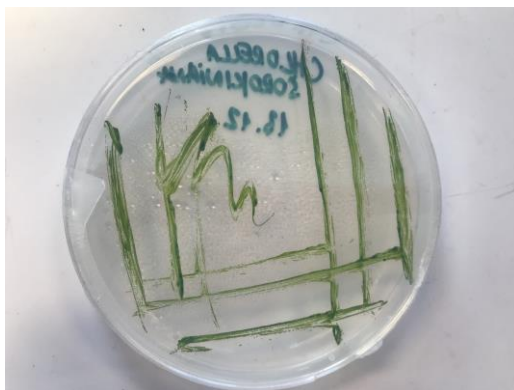
2.2.2 Rod *Chlorella*

Rod *Chlorella* patří mezi nejznámější komerčně využívané řasy po celém světě. Morfologicky se jedná o jednobuněčné a nepohyblivé druhy zelených sladkovodních řas. Pro tento rod je charakteristický sférický nebo elipsoidní tvar buněk s velikostí od 2 do 15 μm . Můžeme zde zařadit rody *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella kessleri* a *Chlorella saccharophila* [27, 28, 29, 30, 31].

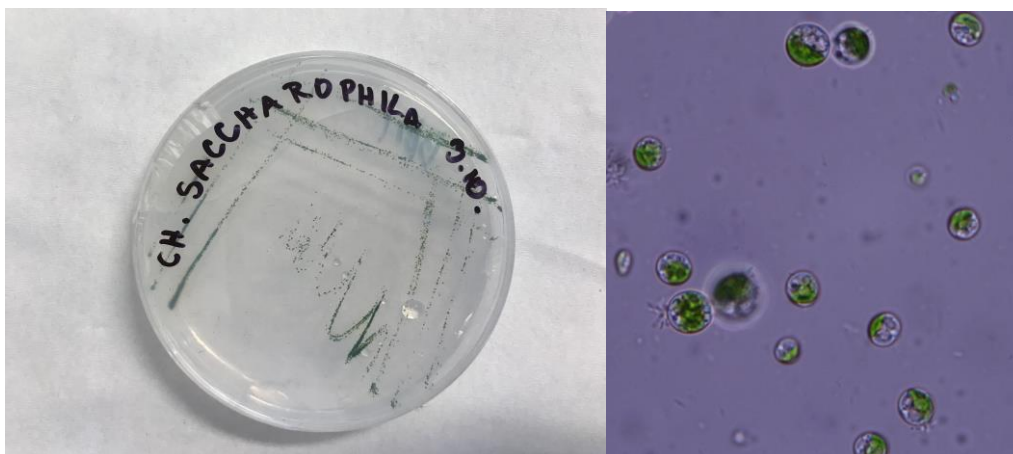
Chlorella se vyznačuje fotosyntetickým aparátem, který dokáže účinně přeměnit světelné záření na chemickou energii. Podobně jako u vyšších rostlin, tak fotosyntéza u tohoto rodu se skládá z reakcí, které jsou závislé na světle a fixaci oxidu uhličitého. Je pozoruhodné, že je schopna provádět fotosyntézu při relativně nízké intenzitě světelného záření. Hodnota intenzity světelného záření pro maximální účinnost fotosyntetického aparátu je 80 až 400 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Vyšší intenzita světelného záření nad 2500 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ je větší, než buňka dokáže přeměnit na chemickou energii, následně dochází k energetickým ztrátám, kde se vytváří teplo. *Chlorella* vyžaduje živiny obsahující uhlík, dusík, fosfor, síru a další kovy. Pokud se nahradí vzdušného za oxid uhličitý a překročí se potřebné koncentrace oxidu uhličitého v médiu, dojde ke snížení pH a následně dojde k inhibici růstu [27, 31, 32, 33, 34, 35, 36].

Za určitých stresových podmínek (deficience dusíku), může dojít ke snížené tvorbě proteinů, a naopak ke zvýšené produkci lipidů uvnitř buněk. Koncentrace dusíku v médiu je klíčová pro regulaci růstu buněk a jejich metabolismu [27, 37].

V současnosti je zájem o řasu rodu *Chlorella* především díky obsahu biologicky prospěšných látek pro lidskou výživu nebo pro výrobu potravinových doplňků. Díky vysokému obsahu lipidů může být v budoucnu využita pro produkci biopaliv [27].



Obrázek 4. *Chlorella sorokiniana*

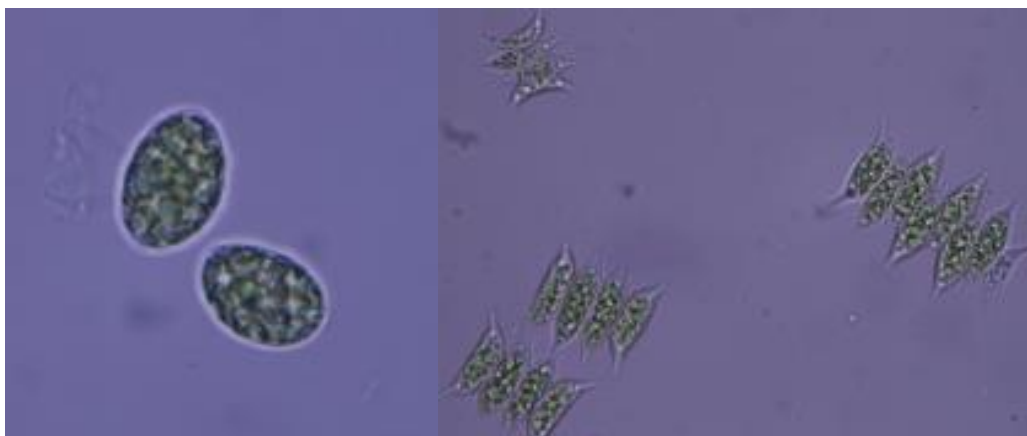


Obrázek 5. Křížový roztěr a mikroskopický snímek kmenu *Chlorella saccharophila*

2.2.3 Rod *Scenedesmus*

Rod *Scenedesmus* je sladkovodní zelená řasa řadící se do třídy *Chlorophyceae*. Ačkoli se může vyskytovat v jednobuněčné formě, tak většinou pozorujeme koloniální uspořádání, kde jednotlivé buňky tvoří cenobia o 2, 4, 8, 16 až 32 jedincích. Co se týče velikosti jednotlivých kmenů, jsou různorodé, ale setkáváme se s velikostí buněk o délce mezi 3–78 μm a šířce 2 až 10 μm . *Scenedesmus* je široce rozšířený, vyskytuje se ve sladkovodních jezerech nebo rybnících po celém světě, kde tvoří plankton. V praxi se využívá při problémech se znečištěním vod, kde při čištění poskytuje kyslík pro bakterie, které jsou schopny odbourávat organické odpady. Jako optimální podmínky pro růst se jeví teplota 28 až 30 $^{\circ}\text{C}$, mírně kyselé prostředí a nízká koncentrace solí [38].

Existuje více než 461 druhů, nicméně pouze 74 z nich bylo taxonomicky uznáno. Mezi zástupce patří například kmen *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus obliquus* a *Scenedesmus abudans* [39].



Obrázek 6. Mikroskopický snímek zleva kmenu *Scenedesmus obliquus* a *Scenedesmus dimorphus*

2.3 Sinice (Cyanobakterie)

Sinice představují jednu z nejstarších forem života na Zemi. Řadí se do skupiny fotosyntetických gram-negativních bakterií. Často se nazývají také modrozelené řasy, díky podobnosti s řasami, pokud jde o získání energie prostřednictvím fotosyntézy. Ve skutečnosti sinice poskytují stejné výhody jako řasy. Podobnost mezi řasami a sinicemi je především podobná rychlost růstu, rovněž využívají slunečné záření jako zdroj energie a spotřeba oxidu uhličitého jako zdroje uhlíku. Pokud se izolují sinice z přírody, často je najdeme v přítomnosti symbiotických bakterií [39].

Sinice patří mezi jednobuněčné prokaryotické organismy, které se ve většině případů seskupují do koloniálních uspořádání. Pokud porovnáváme velikost bakterií, tak sinice mají mnohem větší velikost. Hlavním charakteristickým znakem sinic je přítomnost modrého pigmentu fykocyaninu, který je zabarvuje do modro-zelené barvy. Nachází se v mořské vodě, sladké vodě, nebo dokonce i v půdě. Většina sinic ve vodě žije jako plankton a může vytvářet vodní květ. Některé druhy sinic mohou tvořit toxiny, které jsou životu nebezpečné pro savce a jiné živočichy [39].

Sinice se mohou adaptovat na různá prostředí. Mnoho druhů produkuje skryté buňky nebo různé komponenty, které jsou neaktivní až do té doby, než nastanou lepší podmínky pro jejich růst [39].

2.3.1 Rod *Synechococcus*

Rod *Synechococcus* se řadí se do třídy *Cyanophyta* patří mezi jednobuněčné sinice, které jsou nejdůležitější složky pikoplanktonu. Buňky mají kulovitý tvar a velikost buněk se pohybuje od 0,4 až 6,0 μm . Plankton v oceánech je výlučně zastoupen rodem *Synechococcus*, ale vyskytuje se převážně s další cyanobakterií rodu *Prochlorococcus* [40, 41].

Výskytu rodu *Synechococcus* je hlavně ve slané vodě, ale najdeme ho i brakické a sladké vodě. *Synechococcus* disponuje účinným mechanismem a dokáže se adaptovat na různé koncentrace solí a intenzitu světla. Co se týče jeho odolnosti vůči teplotě, některé kmeny se mohou vyskytovat i v horkých pramenech [40, 41].

Cyanobakterie jsou rovněž vynikajícími producenty polyhydroxybutyrátu, kde mezi významné rody patří spolu s rodem *Synechococcus* také rod *Spirulina*. Mezi další využití je akumulace pesticidů, organických sloučenin obsahujících fosfor a chlor z vodních systémů. Mezi nejznámější patří *Synechococcus nidulans* a *Synechococcus elongatus* [40, 41].

2.3.2 Rod *Arthrospira*

Rod *Arthrospira* (*Spirulina*) se řadí mezi široce rozšířené fotoautotrofní cyanobakterie vyskytující se v koloniích. Kolonie vytváří šroubovice neboli trichomy, které jsou charakteristické pro tento rod. Trichomy mají délku od 50 do 500 μm a šířka se pohybuje od 3 až 4 μm . V přírodě rod *Arthrospira* žije v symbiotickém vztahu s bakteriemi fixujícími dusík ze vzduchu [42].

Najdeme ho především ve sladkých vodách bohatých na uhličitany s vyšším pH. Proto nejvhodnější produkční médium obsahuje anorganické soli a vysokou koncentrací uhličitany, kde pH se udržuje na hodnotě mezi 9 až 10. V tropických oblastech u některých kmenů podporuje jejich růst slaná voda (větší než 30 g/l), vysoké pH (8,5–10) a intenzivní světelné záření. Jako většina sinic je *Arthrospira* přísně fotoautotrofní sinice a její hlavním asimilačním produktem je glykogen. Co se týče teplotního optima, preferuje teplotu mezi 35 °C až 37 °C. Při kultivaci termofilních nebo termotolerantních kmenů při vyšších teplotách (kolem 40 °C) se využívá eliminace mezofilních bakterií způsobujících kontaminace. Naopak během dne se její minimální teplota pohybuje kolem 15 °C, avšak přes noc je schopna snášet relativně nízké teploty. Z hlediska přítomnosti slunečního záření tento rod dokáže tolerovat vysoké intenzity ultrafialového záření. Hlavním fotosyntetickým pigmentem je fykocyanin, který jim dává jejich modro-zelené zabarvení [42].

Mezi nejznámější druhy patří především *Arthrospira maxima* a *Arthrospira platensis*. Na rozdíl od jiných rodů neprodukuje toxiny. *Arthrospira* je sinice bohatá na obsah bílkovin, železa, vitaminů a nenasycených ω -3 a ω -6 mastných kyselin, a proto se široce využívá jako doplněk stravy [42].



Obrázek 7. Mikroskopický snímek kmenu *Arthrospira maxima*

2.4 Metabolity produkované kvasinkami a řasami

2.4.1 Karotenoidy

Karotenoidy patří k nejdůležitějším složkám pro lidskou výživu. Jsou to přírodní barviva rozpustné v tucích, žluté až červené barvy [43, 44]. V současné době je známo více než 700 strukturně odlišných karotenoidů identifikovaných v přírodě [45].

Z chemického hlediska se jedná o tetraterpenoidy o 40 atomech uhlíku, které obsahují 8 izoprenových jednotek. Jsou přítomné především ve fotosyntetické struktuře, kde jejich hydrofobní molekuly jsou asociovány s chlorofyly. Díky konjugovaným vazbám dokáží zachycovat světelné záření v těch oblastech, kde chlorofyly pohlcují světelné záření nedostatečně, proto karotenoidy zvyšují účinnost jeho zachycování. Biologicky působí jako antioxidanty a chrání membránu při zachytávání kyslíku a peroxylových radikálů [44, 47]. Obecně platí, že čím je polyenový řetězec delší, tím je také schopnost stabilizace peroxylových radikálů vyšší. Základní struktura karotenoidů může být modifikována různými způsoby. Především se jedná o hydrogenaci, dehydrogenaci, zkrácení nebo prodloužení původního řetězce, cyklizace, izomerace a řadu jiných reakcí, které vedou k velké rozmanitosti struktur jednotlivých karotenoidů [46].

Karotenoidní pigmenty nalezneme především ve fotosyntetických systémech vyšších rostlin, řas a fototrofních bakterií. Na druhou stranu, pokud se nejedná o fotosyntetické organismy, tak pigmenty slouží jako ochrana proti světelnému záření. Živočichové nedokáží vytvořit karotenoidy de novo, proto je nutný přísun z potravy [44, 49].

Některé karotenoidy jsou významné jako prekurzory vitamínu A, které v lidském organismu fungují jako antioxidanty a snižují riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění, degenerativních onemocnění a rakoviny [43, 44].

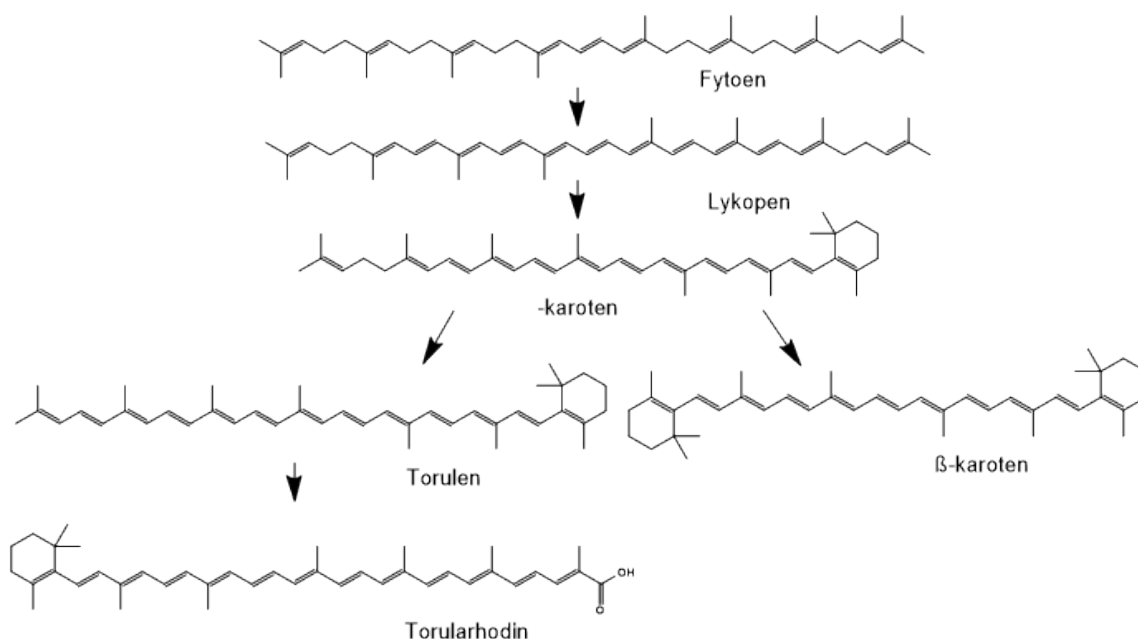
Z hlediska struktury jednotlivé karotenoidy dělíme:

- Karoteny (sloučeniny s uhlíkatým řetězcem)
- Xanthofyly (kyslíkaté deriváty) [43, 44].

2.4.1.1 Karoteny

Karoteny jsou strukturně uhlovodíky s nejméně 40 uhlíkatými jednotkami. Z acyklických polynenasycených karotenů patří mezi nejznámější lykopen. Lykopen je nejjednodušší karoten, ze kterého cyklizací vzniká α -karoten a β -karoten lišící se pouze polohou dvojné vazby v koncové cyklické skupině.

Mezi další karoteny syntetizované karotenogenními kvasinkami se řadí torulen, který díky 13 konjugovaným vazbám vykazuje silné antioxidační schopnosti. Jsou syntetizovány především rody *Rhodospiridium*, *Cystofilobasidium*, *Rhodotorula* nebo *Sporidiobolus* [44].



Obrázek 8. Metabolická dráha syntézy karotenoidů u rodu *Rhodotorula* [48]

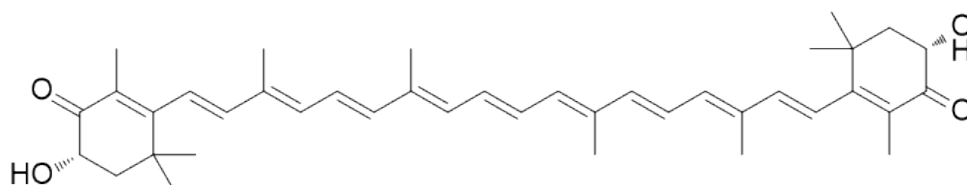
2.4.1.2 Xanthofyly

Xanthofyly jsou kyslíkaté deriváty karotenů, v jejichž struktuře nacházíme karboxylovou, karbonylovou, hydroxylovou a hydroxymethylovou skupinu. Torularhodin díky přítomnosti karboxylové skupiny řadíme do skupiny xanthofylů a je rovněž syntetizován výše zmíněnými rody kvasinek. Dále do této skupiny řadíme například astaxanthin a canthaxanthin [44, 49].

Astaxantin je sloučenina, která se tradičně syntetizuje chemicky, ale výsledkem je směs chirálních forem. Přírodní formy astaxanthinu sestávají pouze z jedné chirální isoformy. Přírodní zdroje zkoumané pro krmivo a potraviny zahrnují především kvasinky rodu *Xanthophyllomyces dendrorhous* nebo řasy rodu *Haematococcus pluvialis*. Z ekonomických důvodů nelze využít extrakce z korýšů kvůli nízké koncentraci astaxanthinu.

Kmeny *Xanthophyllomyces dendrorhous* jsou již využívány v průmyslovém odvětví, kde jejich produkce této sloučeniny je 5 – 15 mg/kg biomasy. Kvasinky produkující astaxanthin jsou považovány za bezpečné pro lidskou spotřebu. Astaxantin je považován za silný antioxidant a může být využíván jako doplněk stravy, který může zabránit degenerativním onemocněním a stárnutí. Řasa rodu *Haematococcus pluvialis* je rovněž přírodním zdrojem astaxanthinu, kde produkce dosahuje až 20 mg/g biomasy, ale kultivace vyžaduje delší a speciální podmínky.

Astaxanthin je komerčně využíván jako doplněk do krmných směsí, hlavně pro krmení lososů. Tento pigment může mít další využití pro krmení drůbeže, korýšů, exotických ptáků [7, 51, 52, 53].



Obrázek 9. Astaxanthin

2.4.2 Biosyntéza isoprenoidů

2.4.2.1 Biosyntéza mevalonové kyseliny

První krok biosyntézy je produkce mevalonové kyseliny. Výchozí sloučeninou pro biosyntézu isoprenoidů je acetyl-CoA. Jak je znázorněno na schématu (Obrázek 10), nejprve dvě molekuly acetyl-CoA kondenzují za katalýzy thiolasy a vzniká molekula acetoacetyl-CoA, který je rovněž meziproduktem syntézy mastných kyselin. Ve druhém kroku acetoacetyl-CoA kondenzuje se třetí molekulou acetyl-CoA, čímž dojde ke vzniku šestiuhlíkaté sloučeniny 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (dále HMG-CoA). Reakce je katalyzována HMG-CoA synthasou. Ve třetím kroku se redukuje HMG-CoA za spotřeby dvou molekul NADPH na mevalonát za katalýzy HMG-reduktasy, která je hlavním regulačním krokem syntézy sterolů [3, 54].

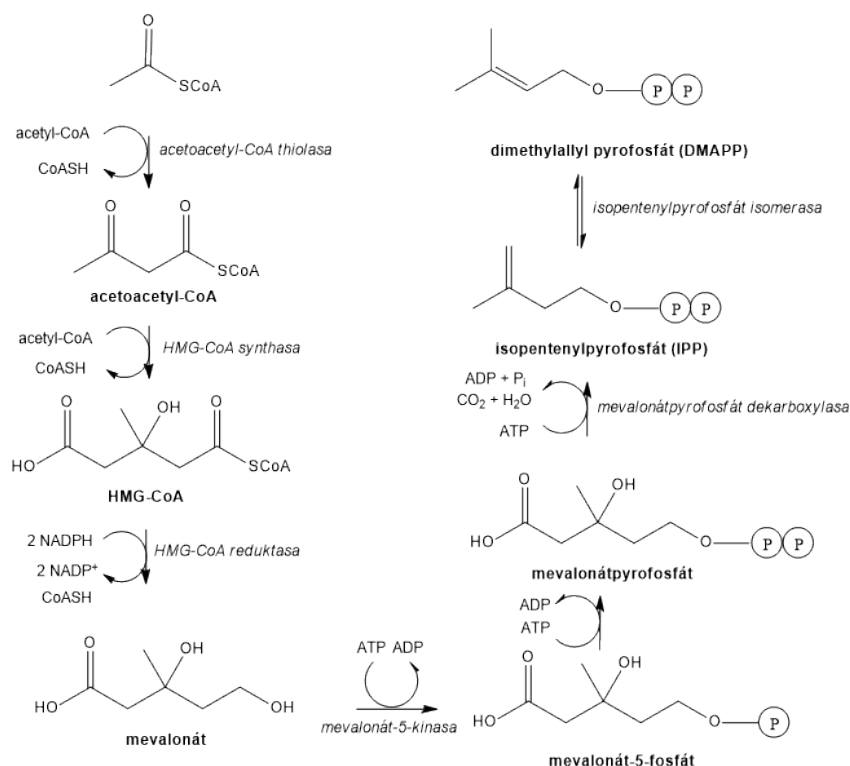
2.4.2.2 Syntéza isopentenylpyrofosfátu

Další reakce vyžaduje vyšší energetickou náročnost. V první řadě dojde k aktivaci mevalonátu třemi molekulami ATP a vzniká 3-fosfo-5-difosfomevalonát. Vzhledem k nízké stabilitě meziprojektu dojde k dekarboxylaci a odstoupení P_i za vzniku isopentenylpyrofosfátu (IPP), který izomeruje v rovnovážné reakci na dimethylallylpyrofosfát (DMAPP) [3, 54].

2.4.2.3 Vznik izoprenoidů

IPP a DMAPP spolu kondenzují ve směru „hlava–pata“, z DMAPP dojde k odštěpení PP_i a vzniká geranylpyrofosfát (GPP), který je prekurzorem pro syntézu monoterpenů. Ten následně může kondenzovat s další molekulou IPP a vytvoří farnesylpyrofosfát (FPP), jež je prekurzorem pro biosyntézu seskviterpenů. Pokud dojde k prodloužení FPP kondenzací s IPP vzniká geranylgeranylpyrofosfát (GGPP) [3, 54].

Jestliže dojde ke kondenzaci ve směru „pata k patě“ dvou molekul FPP a současně probíhá redukce, vzniká skvalen, jež je prekurzor pro syntézu steroidů. Stejným způsobem vzniká ze dvou molekul GPPP fytoen, který je prekurzorem pro syntézu karotenoidů [3, 54].



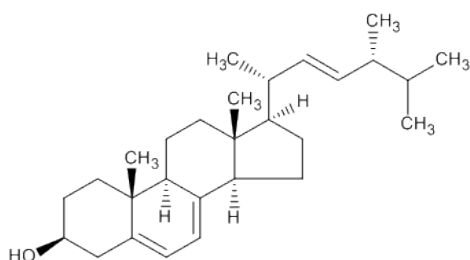
Obrázek 10. Schéma syntézy izoprenoidů [54]

2.4.3 Ergosterol

Ergosterol se z chemického hlediska řadí mezi steroly, které jsou odvozené od steranu. Jeho struktura a funkce v organismu je značně podobná s cholesterolem. Cholesterol je hlavním steroidem savců, kdežto ergosterol je produktem biosyntézy sterolů v houbách a kvasinkách.

Jeho hlavní funkcí je v první řadě regulace permeability a tekutosti buněčné membrány, ale je rovněž prekurzorem steroidního hormonu vitaminu D₂ neboli ergokalciferolu. Ten se působením UV záření mění na vitamin D₂, který hraje důležitou roli v metabolismu esenciálních minerálů vápníku, fosforu a hořčíku [55].

Přeměna na vitamin D₂ neprobíhá přímo, ale přes řadu meziproduktů, jako lumisterol a tachysterol. Při vysokých dávkách UV záření může dojít ke vzniku toxických produktů, jako je například toxisterol. Experimentálně bylo zjištěno, že kvasinky akumulující zvýšené množství tuku produkují méně ergosterolu. Tento efekt byl rovněž pozorován u kvasinek vystavených zvýšenému světelnému záření [1, 4].



Obrázek 11. Ergosterol

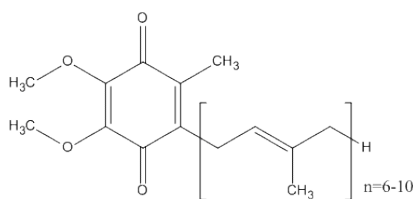
2.4.4 Koenzym Q₁₀

Koenzymy Q se řadí do skupiny ubichinonů, které ve své struktuře obsahují chinonové jádro a vedlejší řetězec izoprenového charakteru. Mezi nejznámější patří koenzym Q₁₀, který obsahuje celkem 10 izoprenových jednotek. Tato molekula se nachází v aerobních organizmech od bakterií po savce a je zastoupena téměř ve všech buňkách v lidském organismu [55].

Z biologického hlediska slouží v organismu jako přenašeč elektronů v elektron-transportním řetězci pro produkci ATP uvnitř mitochondrií. V dýchacím řetězci je molekula koenzymu Q zodpovědná za přenos elektronů z komplexu I (NADH dehydrogenasa) a do proteinového komplexu III, označovaného jako koenzym Q-cytochrom c oxidoreduktasa. Dochází zde k redukci ubichinonu na ubichinol, který putuje ke komplexu III (koenzym Q-cytochrom c oxidoreduktasa) [56].

Následně jiná molekula ubichinonu přenáší elektrony z komplexu II (sukcinát-koenzym Q oxidoreduktasy) do komplexu III. Komplex I transportuje elektrony z NADH na koenzym Q a komplex II přenáší elektrony z FADH₂ na koenzym Q. Při přijímání elektronů, jak z komplexu I, ale i z komplexu II zůstává molekula koenzymu v redukované formě jako ubichinol, až po přenosu elektronů do komplexu III se oxida zpátky na ubichinon [56].

Dále ve své redukované formě působí koenzym Q₁₀ jako antioxidant, který se může účastnit redoxních reakcí a působí jako prevence proti poškození DNA a proteinů [56].



Obrázek 12. Koenzym Q_n

2.4.5 Chlorofyly

Slunce je zdrojem energie pro život na Zemi, kterou dokáží zachycovat fotosyntetické organismy pomocí fotosyntézy. Nicméně v organismech existuje mnoho fotosyntetických pigmentů, jako například karotenoidy nebo fykobiliny, ale nejdůležitější molekulou je chlorofyl. Molekuly chlorofylu převádí slunečnou energii na chemickou energii, která následně slouží pro tvorbu sacharidů [57].

Chlorofyly jsou zelené pigmenty fotosyntetických organismů, které se nachází v membránových organelách zvaných chloroplasty. Tyto fotoaktivní pigmenty najdeme u různých vyšších rostlin, řas a také fotosyntetických bakterií. Nicméně chlorofylů je více druhů a lze je rozdělit do skupin A, B, C, D, E a F [57].

Mezi hlavní chlorofyly patří chlorofyl A a chlorofyl B. Z chemického hlediska jsou chlorofyl A a chlorofyl B deriváty dihydroporfyriu, kde uprostřed kruhu je chelátově vázán atom hořčíku. Postranní řetězce základní molekuly chlorofylu určují znaky dalších typů chlorofylů a především vytváří změny v absorpčním spektru slunečního záření. Molekula chlorofylu A disponuje dlouhým hydrofobním řetězcem, který je ukotvený k hydrofobním proteinům v tylakoidní membráně. Mezi chlorofylem A a chlorofylem B je z hlediska struktury rozdíl v navázané CHO skupině na CH_3 v poloze C-7 u chlorofylu B [57].

Chlorofyl A se vyskytuje ve všech fotosyntetických rostlinách, stejně tak i ve fotosyntetických bakteriích. Ve fotosyntetických buňkách chlorofyl A absorbuje červené světlo při vlnové délce od 670 nm do 480 nm. Chlorofyl B se vyskytuje pouze ve vyšších rostlinách a zelených řasách. Charakteristickým znakem je žlutá barva pigmentu a absorbuje modré světelné záření při vlnové délce 480 nm do 650 nm [58].

Dále je v přírodě méně přítomný chlorofyl C, který se nachází jako minoritní složka spolu s chlorofylem A v hnědých mořských řasách. Chlorofyl C ve své struktuře neobsahuje dlouhý uhlovodíkový řetězec v poloze C-17 akrylátového substituentu. Jeho funkce v procesu fotosyntézy je zejména zvýšená absorpce světla, hlavně v modré oblasti, protože pigment má posunuté absorpční maximum oproti chlorofylu A a chlorofylu B [58].

Chlorofyl D se vyskytuje rovněž v minimálních množstvích, a to pouze v červených řasách (*Rhodophyta*). V chlorofylu D je divinyllová skupina v poloze C-3 nahrazena formylovou skupinou oproti chlorofylu A. Chlorofyl D se výrazně liší od ostatních chlorofylů, kde jeho absorpční maximum je posunuto spíše do blízké infračervené oblasti. Chlorofyl D je podobný spíše bakteriochlorofylům, které rovněž absorbují v blízké infračervené oblasti (kromě bakteriochlorofylu E, který absorbuje v oblasti 715 nm až 725 nm) [59].

Velmi vzácným typem je chlorofyl E nacházející se ve žlutých řasách *Vaucheria hamata* a *Tribonema bombicinum* [57,59].

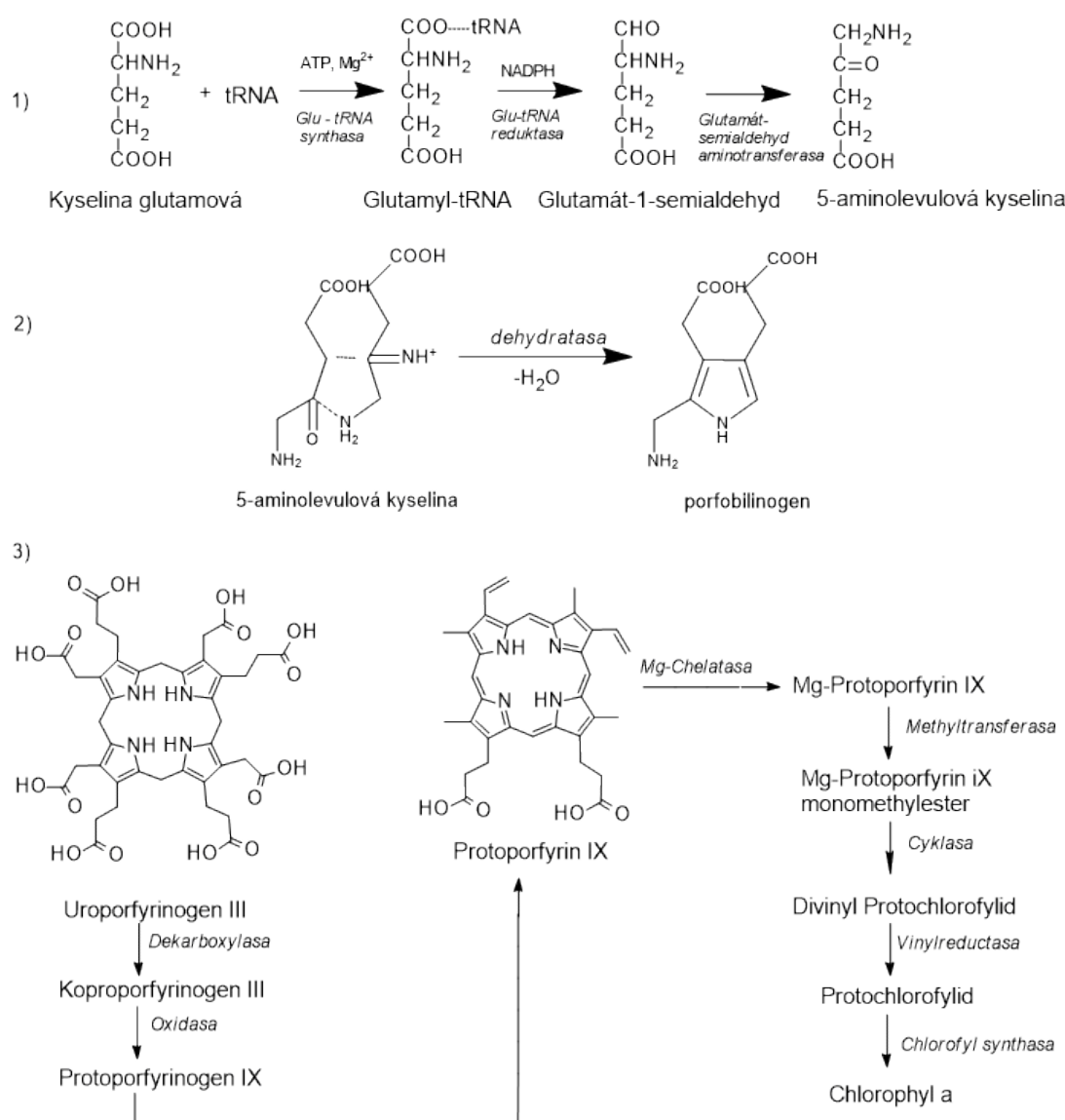
V sinicích je přítomný chlorofyl F, který je považován za doplňkový pigment chlorofylu A. Některé sinice jsou schopny využívat vzdálenou část červeného spektra tím, že si dokáží syntetizovat pigmenty typu chlorofylu F a tím rozšíří spektrální rozsah pro fotosyntézu. Experimentálně bylo zjištěno, že sinice obsahují zvýšený obsah chlorofylu F, když jsou kultivovány v blízkosti infračerveného záření, nikoli bílého světla. Z hlediska struktury je chlorofyl F transformován z chlorofylu A v poloze C-2 methyly na formylovou skupinu [54, 57, 60, 61, 62].

2.4.6 Biosyntéza chlorofylu

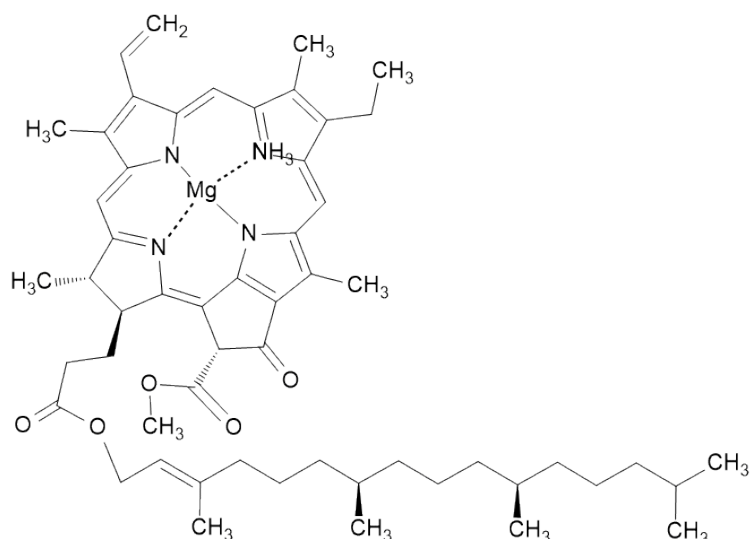
První fází syntézy chlorofylu je syntéza 5-aminolevulové kyseliny. U vyšších rostlin, cyanobakterií a řas dochází připojení glutamátu na tRNA za vzniku aktivovaného glutamyl-1-tRNA, který je následně redukován na glutamát-1-semialdehyd za katalýzy glu-tRNA reduktasy. Glutamát-1-semialdehyd se následně přeměňuje na 5-aminolevulovou kyselinu (ALA) [63].

Následuje reakce, kde dochází ke kondenzační reakci dvou molekul 5-aminolevulové kyseliny, kde vzniká porfobilinogen za katalýzy ALA-dehydratasy. Poté reagují čtyři molekuly porfobilinogenu, kde následně uroporphyrinogensynthasa, která pracuje spolu s kofaktorem uroporphyrinogenkosynthasou, katalyzuje syntézu uroporphyrinogenu III. Dále jak je vidět na Obrázek 13 uroporphyrinogen III je dekarboxylován uroporphyrinogen-synthasou na koproporphyrinogen III. V další reakci dojde k oxidaci propionylových zbytků na vinylové a vzniká protoporphyrin IX.

Do protoporphyrinu IX se následně vnese ion Mg^{2+} za katalýzy Mg-chelatasy a vzniká Mg-protoporphyrin IX, který se poté esterifikuje propionovým postranním řetězcem za katalýzy methyltransferasy. Následně (Obrázek 13) dojde k cyklizaci za vzniku divinyl protochlorofylidu. Jako předposlední krok následují redukční reakce za vzniku protochlorofylidu. Poslední krok syntézy chlorofylu A je katalyzován chlorofyl-synthasou. Tento enzym esterifikuje propionový kyselý postranní řetězec kruhu IV s fitypyrofosfátem a vzniká chlorofyl A [63].



Obrázek 13. Biosyntéza chlorofylu [63]



Obrázek 14. Chlorofyl A

2.4.7 Lipidy

Lipidy představují přirozeně se vyskytující organické chemické sloučeniny. Vykazují hydrofobní charakter, a proto jsou velmi dobře rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Mezi hlavní biologicky významné lipidy patří zejména mastné kyseliny, triacylglyceroly (TAG), fosfolipidy, cholesterol a další estery. Dále mezi lipidy můžeme zařadit steroidní hormony, vitaminy rozpustné v tucích a eikosanoidy [64].

V organismu mají lipidy za úkol plnit velmi důležité funkce. Slouží zejména jako zdroj a rezerva energie, poskytují izolační a mechanickou ochranu a jejich transportní forma tzv. lipoproteiny se podílejí na transportu látek (například vitaminů rozpustných v tucích). Další důležitou funkci v organismu plní látky s polární a nepolární strukturou, tzv. fosfolipidy, které se nachází v buněčných membránách všech buněk. V buněčné membráně molekuly fosfolipidů slouží k prostupu látek dovnitř buněk a ven z buněk a také jako ochranná bariéra [64].

Lipidy mohou být využity jako alternativa pro produkci biopaliv. Řasy, kvasinky a bakterie mohou za určitých podmínek kultivace syntetizovat vysoké množství lipidů a mezi hlavními výhodami jejich využití nelze opomenout skutečnost, že mikroorganismy nejsou ovlivněny sezónními změnami. Tyto oleogenní mikroorganismy mohou akumulovat více než 20 % lipidů v biomase. V buňkách mikroorganismů se nachází převážně triacylglyceroly (TAG), jsou skladovány intracelulárně jako zásoba uhlíku a energie. K syntéze TAG začíná až po syntéze fosfolipidů během exponenciální fáze růstu a dále při narušení buněčného růstu, za nadměrného množství uhlíku a limitovaného množství dusíku.

Typy syntetizovaných lipidů jsou rozdílné a liší se mezi prokaryoty a eukaryoty. Díky schopnosti řas, kvasinek a hub akumulovat TAG polynenasycených mastných kyselin, jsou v budoucnu vhodnou alternativou pro produkci bionafty kvůli chemické podobnosti s rostlinnými oleji [65].

2.4.7.1 Mastné kyseliny

Základní součástí lipidů jsou monokarboxylové kyseliny, které jsou v biologických systémech nejčastěji složeny z 14 až 24 uhlíků a jsou označovány jako mastné kyseliny (dále MK). MK se nejčastěji nevyskytují volně, ale jako esterifikovaná forma v lipidech (triacylglyceroly, fosfolipidy a cholesterol) [3, 65, 66].

V organismech najdeme MK především se sudým počtem atomů uhlíku a můžeme je rozdělit v závislosti počtu dvojných vazeb na MK nasycené nebo nenasycené. Nasycené MK obsahují ve své struktuře pouze jednoduché vazby mezi atomy uhlíku.

Naopak nenasycené MK jsou charakteristické přítomností jedné nebo více dvojných vazeb. Nenasycené MK s jednou dvojnou vazbou jsou označovány jako mononenasycené (MUFA) a pokud obsahují více dvojných vazeb, tak se jedná o MK polynenasycené (PUFA) [66].

Atomy uhlíku se zpravidla číslují od atomu uhlíku karboxylové kyseliny, ale pro označené polohy dvojných vazeb číslování začíná od methylového konce a označujeme jako ω . Podle toho označujeme MK s polohou dvojných vazeb na třetím uhlíku jako ω -3 MK, na šestém uhlíku ω -6 MK a na devátém ω -9 MK [66]. Polynenasycené mastné kyseliny jsou syntetizovány pouze rostlinami, fytoplanktonem a jsou esenciální pro vyšší organismy. Ačkoli mají PUFA příznivé účinky na lidské zdraví, tak mají v těle protichůdné metabolické účinky. ω -6 jsou zodpovědné za tvorbu látek způsobujících akutní zánět a ten způsobí ochranu před infekcí. Naopak ω -3 jsou pomáhají zánět zmírnit a dále se podílejí na ochraně před diabetem, metabolickými poruchami, osteoporózou a neurologickým onemocněním [66].

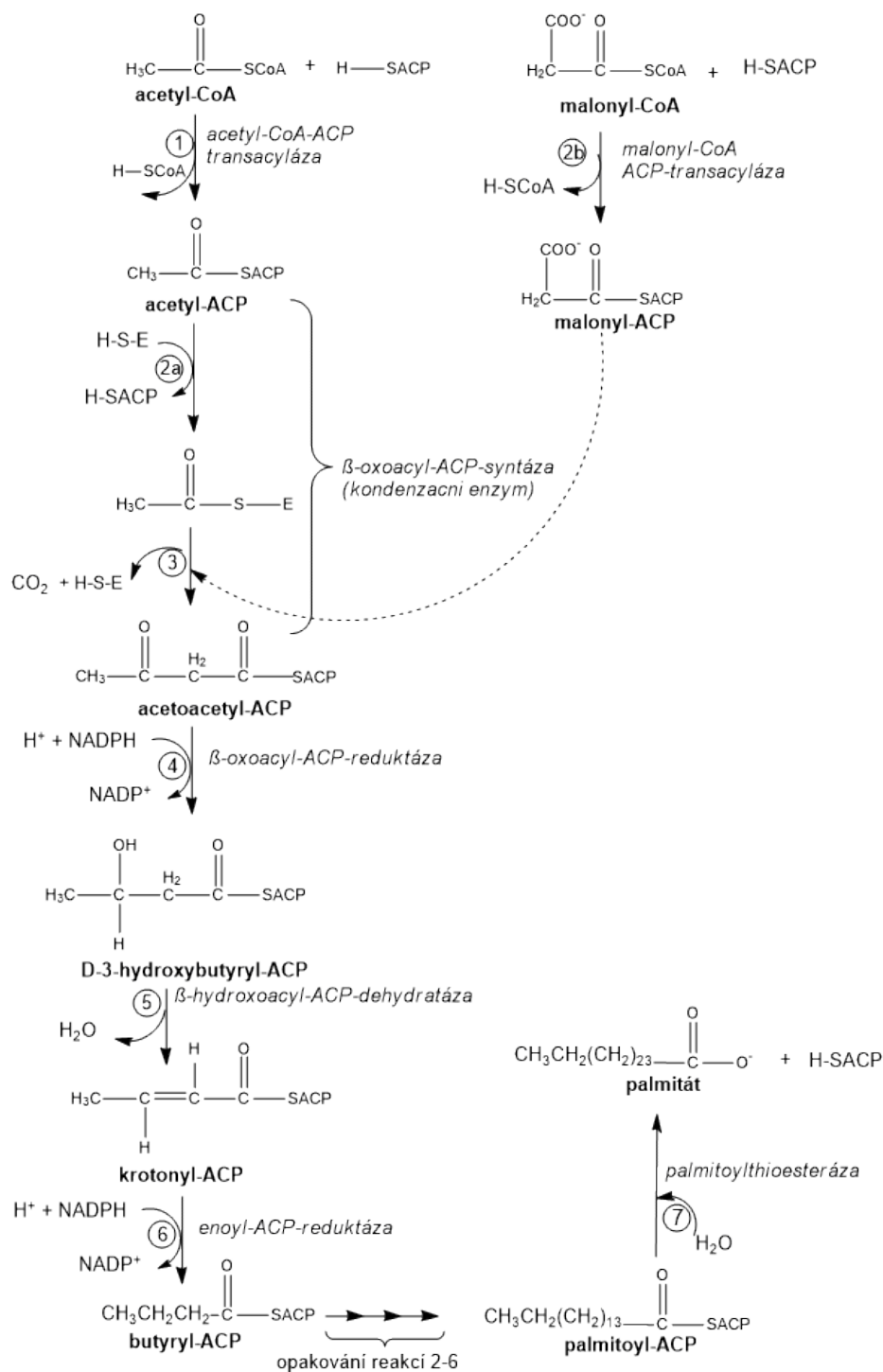
2.4.8 Biosyntéza vyšších mastných kyselin

Biosyntéza mastných kyselin je obdobná jako oxidace mastných kyselin, avšak jsou zde přítomny jiné enzymy, redoxní koenzymy a karboxylační reakce. Rozličné je také umístění metabolických dějů. Zatímco degradace mastných kyselin je lokalizována v mitochondriích, biosyntéza probíhá v cytosolu a meziproducty syntézy jsou thioestery bílkovin označované jako ACP (acyl carrier protein). K biosyntéze MK jsou k redukčním reakcím nutné vodíky, a to poskytuje NADPH vyprodukované v pentózovém cyklu nebo u fotosyntetických organismů se získává ve světelné části fotosyntézy. Syntéza MK je kondenzační reakce, kde se řetězec mastné kyseliny syntetizuje po dvouuhlíkatých jednotkách z energeticky výhodnějšího malonyl-CoA [3, 54].

Na Obrázek 15 je schematicky znázorněna syntéza palmitové kyseliny. V první fázi biosyntézy (1–2) proběhne aktivační reakce, která spočívá v nevratné karboxylaci acetyl-CoA, za hydrolýzy ATP, která je katalyzována biotin-dependentní acetyl-CoA karboxylasou za vzniku energeticky bohatší sloučeniny malonyl-CoA. Výchozí acetyl-CoA se získává při oxidaci buď dekarboxylaci pyruvátu v rámci odbourávání sacharidů, nebo při oxidaci jiných MK. Následně β -oxoacylsyntasa katalyzuje kondenzační reakci, kde se vážou prekursor acetyl-CoA nebo acyl-CoA [3, 54].

Na schématu je znázorněna reakce (bod 3), kde dojde k dekarboxylaci malonyl-ACP za vzniku karbaniontu. Ten poté napadá acetylthioester za vzniku β -oxoacyl-ACP [3, 54].

Dále (bod 4–6) proběhne redukce acetoacetyl-ACP (koenzym NADPH) za vzniku D-3-hydroxybutyryl-ACP a následná dehydratace a vzniká krotonyl-ACP. Poté proběhne opětovná redukce (FADH_2) za katalýzy enoyl-ACP reduktasou za vzniku butyryl-ACP. V tomto kroku dojde ke změně ketonu na alkylovou skupinu. Již v této reakci je viditelné prodloužení původní acetylové skupiny o dvě uhlíkaté jednotky. V další části se opakují reakce v kroku 2a, kde ACP je opětovně energeticky nabitý malonylovou skupinu, opakuje se cyklus stejným výše popsaným mechanismem a vzniká mastná kyselina prodloužená o další dvě uhlíkaté jednotky. Pokud syntetizujeme palmitovou kyselinu, tak ke vzniku palmitoyl-ACP je nutno, aby cyklus proběhl celkem sedmkrát. Poslední krok biosyntézy palmitátu spočívá v hydrolýze thioesterové vazby palmitoyl-ACP za katalýzy palmitoylthioesterasy [3, 54].



Obrázek 15. Schéma syntézy mastných kyselin [54]

2.5 Vliv vnějších faktorů na mikroorganismy

Faktory ovlivňující živé organismy mohou být biologické, fyzikální a nutriční. Mezi fyzikální stresy řadíme: světelné záření, absence světelného záření, oxidační stres, působení těžkými kovy, pH prostředí, salinita a teplota. Co se týče nutričního stresu, tak se může využít limitace některých prvků – například S, C, P nebo N k nadprodukci vybraných metabolitů. Při využití odpadních substrátů se jedná rovněž o nutriční stres. Jako poslední jsou biologické stresy, kde využíváme vzájemné interakce u směsných kultur.

2.5.1 Biologické faktory

2.5.1.1 Ko-kultivace

Ko-kultivace se řadí mezi biologické stresové faktory, kde se využívá interakcí mezi dvěma nebo více mikroorganismy. Předem zvolené druhy mikroorganismů se synchronně kultivují ve shodném produkčním médiu. Této kultivace se využívá především při čištění odpadních vod, syntéze bioaktivních látek nebo rovněž při degradaci halogenů a uhlovodíků [67, 68, 69]. Pokud se podaří úspěšná kombinace mikrořas s kvasinkami, dojde k příznivému ovlivnění výměny plynů a úpravy pH média. Kupříkladu byla provedena kultivace kombinací *Spirulina platensis* a *Rhodotorula glutinis* nebo *Scenedesmus obliquus* a *Candida tropicalis* [67, 70].

Teoreticky se může předpokládat, že fotoautotrofní růst řas může generovat kyslík dále využitelnými heterotrofními druhy kvasinek, kdežto kvasinky by řasám mohly poskytovat oxid uhličitý. Rovněž další sekundární metabolity u řasových kultur můžou mít stimulační účinek pro kvasinkový růst [67, 71].

Využití smíšených kultur má potenciál při biokonverzi průmyslových odpadních látek, čímž může přispívat k ochraně životního prostředí a snížení vzniku skleníkového efektu. Experimentálně bylo zjištěno, že při vzájemné interakci *Chlorella pyrenoidosa* a *Rhodotorula glutinis* v poměru 3:1 byla dosažena zvýšená produkce lipidů oproti monokultuře [68, 72].

2.5.2 Fyzikální a chemické faktory

2.5.2.1 Teplota

Teplota je jedním z nejdůležitějších parametrů ovlivňujících mikroorganismy. Vyšší teplota urychluje biosyntetické dráhy, ale i degradační procesy, kdy dochází k inaktivaci enzymů katalyzujících biochemické reakce. Naopak nižší teplota zpomaluje nebo až zastavuje růst mikroorganismů. Definujeme teplotu minimální a maximální, při které mikroorganismy jsou schopny se rozmnožovat. Naopak při optimu jsou rychlosti rozmnožování nejvyšší. Rovněž můžeme definovat teplotu letální, při níž dochází k usmrcení mikroorganismů [3].

Většina laboratorních a průmyslových kmenů kvasinek je mezofilních a preferuje teplotu mezi 20 °C až 30 °C, ale najdou se i psychofilní rody jako *Torulopsis spp.* a termofilní kmeny, například *Saccharomyces telluris* [73]. Z hlediska produkce karotenoidů u červených kvasinek, je potřeba brát v úvahu, že teplota je dalším parametrem ovlivňujícím růst buněk, metabolitů a působí změnu aktivity biosyntetických drah, včetně produkce karotenoidů, kde teplotní účinek ovlivňuje koncentrace enzymů při jejich syntéze. Vliv teploty závisí také na druhu mikroorganismu, ale například u kvasinky *Rhodotorula glutinis* bylo zjištěno, že maximální produkce biomasy a karotenoidů je při teplotě 30 °C [44, 74].

U řas byla optimální teplota pozorována v rozmezí 15 °C do 30 °C, ale liší se to od druhu jednotlivých rodů řas. Mimo optimální teploty může dojít k poškození nebo letálnímu účinku mikroskopických řas, kvůli zvýšení nebo snížení funkce fotosyntetického aparátu [75, 76]. Experimentálně bylo zjištěno, že růst biomasy a syntéza lipidů se do určité míry exponenciálně zvyšuje s rostoucí teplotou [77, 78].

Například u rodu *Scenedesmus sp.* byl pozorován zvýšený nárůst lipidů a biomasy při 20 °C. Dále rod *Chlorella* je znám širokým rozmezím teplot, ve kterém jsou tyto mikrořasy schopny růstu. Teplotní rozsah se pohybuje od 5 °C do 30 °C [75, 76].

2.5.2.2 Světelné záření

Na mikrobiální buňky má nepříznivý efekt zejména záření o kratších vlnových délkách. Můžeme zde zařadit také ultrafialové záření o vlnové délce 265 nm, které působí letálně. Hlavní způsob inaktivace nastává, když dojde k absorpci fotonu, následně se vytváří mezi sousedními thyminovými bázemi pyrimidinové dimery a mikroorganismus není schopen další replikace [79].

Světlo je v přírodě vyzařováno jak ve viditelných, tak neviditelných vlnových délkách. Co se týče červených kvasinek, jsou vůči záření relativně odolné. Karotenogenní kvasinky se působením zvýšené intenzity světelného záření přizpůsobily produkcí antioxidantů a fotoprotektantů tzv. karotenogenezí [3, 44].

Pro fotoautotrofní mikroorganismy je intenzita a složení světelného záření důležitým parametrem fotosyntézy. Ale pouze některé vlnové délky světla jsou transformovány na energii v procesu fotosyntézy. Studiemi bylo prokázáno, že řasy díky chlorofylu A a chlorofylu B vykazují lepší růst v modrém a červeném světle. Světelný faktor je důležitý pro řízení produkce řasové biomasy a lipidů. Pokud se aplikuje extrémně vysoká intenzita světelného záření, může to zapříčinit fotoinhibici, následně se poškodí fotosystémy a tím dojde ke snížené schopnosti akumulace lipidů [44, 80].

U kultivace řas je nutno použít vhodný umělý zdroj světla. Kromě volby správného zdroje světelného záření, je nutné brát ohled na správnou intenzitu. Při extrémní světelné intenzitě v procesu fotosyntézy dochází k fotooxidaci, kde je molekula chlorofylu excitována do tripletového stavu. Tento stav je velmi reaktivní, následně reaguje s kyslíkem a navrací se do základního stavu.

Excitovaný kyslík je velmi reaktivní a reaguje s mastnými kyselinami za vzniku lipidových peroxidů, které zapříčiní destrukci membrán, což vede až k odumírání buněk. Naopak nižší intenzita záření zapříčiní excitaci pouze do prvního singletového stavu, fotosyntéza probíhá pomaleji a kvůli tomu dojde ke snížení růstu biomasy [80, 81, 82].

Co se týče konkrétních rodů řas, experimentálně bylo zjištěno, že *Chlorella sorokiniana* byla schopna zvýšit syntézu lipidů při zvýšeném osvětlení $600 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Následně další studie ukazuje na nadměrnou produkci lipidů pomocí *Botryococcus sp.* Až 32,77 % lipidů vztaženo na hmotnost biomasy při intenzitě $110 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ [76, 77, 83, 84].

2.5.2.3 Vliv na obsah vody a soli

Vodní aktivita je definována jako poměr tlaku par nad roztokem k tlaku par čisté vody při stejné teplotě. Vzhledem k tomu, že metabolismus mikroorganismů probíhá ve vodném prostředí, tak je nutno zajistit postačující množství volné vody, která není vázána na rozpuštěné látky a mikroorganismy ji mohou využívat pro chemické a biologické reakce. Z tohoto důvodu má aktivita vody účinek na přítomnost mikroorganismů. Převážná většina mikroorganismů preferuje aktivitu vody od 0,6 do 0,99. Řasy a bakterie vyžadují pro svůj život převážně vyšší aktivity vody, zatímco některé osmotolerantní kvasinky jsou schopny se rozmnožovat při aktivitě 0,73 [3, 85].

S vodní aktivitou souvisí rovněž osmotický tlak prostředí působící na buňky. Čím je vyšší koncentrace rozpuštěných látek, tím se snižuje aktivita vody v prostředí a zvyšuje se osmotický tlak. Mikroorganismy jsou schopny zvládnout osmotický tlak prostředí od 0,55 do 0,1 MPa. Vzhledem k tomu, že voda proudí napříč membránou směrem k vyšší koncentraci rozpuštěné látky, jsou biologické membrány pro vodu více propustné než pro většinu rozpuštěných látek. Zvýšení vnější osmolarity (hyperosmotický stres) vede k odtoku vody ven z buňky, zatímco hypoosmotický stres zapříčiní přítok vody do buňky. Tento tlakový rozdíl je potlačován resistencí buněčné stěny. Mikroorganismy se snaží udržet mírně vyšší osmotický tlak oproti vnějšímu prostředí.

Když se změní vnější osmotický tlak, buňka se snaží přizpůsobit jejich vnitřní osmolaritu. Po vystavení mikroorganismů hyperosmotickému šoku dochází k produkci a následné akumulaci osmoprotektantů, které zapříčiní zvýšení vnitřní osmolarity.

Naopak po aplikaci hypoosmotického šoku musí buňky rychle exportovat rozpuštěnou látku, aby se zabránilo nadměrnému turgoru. Zvýšený osmotický stres vyvolaný NaCl může být exogenním faktorem, který stimuluje zvýšenou karotenogenezi [86, 87, 88, 89].

Studiemi bylo prokázáno, že některé kmeny karotenogenních kvasinek jako *Rhodotorula glutinis* a *Rhodotorula mucilaginosa* syntetizovaly karotenoidy až šestinásobně více po přidání 10% NaCl na počátku fáze růstu v porovnání s kontrolním médiem [86, 87, 88]. Aby řasy odolávaly osmotickému tlaku zapříčiněnému solným stresem, může docházet ke zvýšené produkci sacharidů nebo lipidických látek v závislosti na daném kmenu řas. V případě, že jsou řasové buňky vystaveny fyziologickému prostředí, dojde k obnovení turgoru, adaptaci a následnému uvolňování iontů přes membránu a akumulaci metabolitů odolných vůči osmóze. Bylo prozkoumáno, že u mnoha druhů řas po aplikaci solného stresu v pozdní exponenciální fázi docházelo ke zvýšené akumulaci lipidů. Kupříkladu *Chlorella vulgaris* měla při solném stresu zvýšenou tendenci tvorby lipidů až o 21,1 % [77, 90].

2.6 Metody zpracování buněk a jejich metabolitů

2.6.1 Extrakce

Účel extrakce je především izolace analytu od matrice nebo látek způsobující rušivé vlivy při stanovení. Proces extrakce je dělicí metoda, kde se využívá selektivního přechodu konkrétní složky mezi dvě vzájemně se nemísitelné kapaliny nebo mezi kapalnou a tuhou fází. Částice se přemísťují z tuhé fáze do roztoku nebo v případě dvou kapalných fází, dochází k přechodu z jedné kapalně fáze do druhé. Uplatňují se zde interakce mezi molekulami rozpouštědla a mezi molekulami analytu. Výběr vhodného rozpouštědla je závislý na typu interakcí, které se v systému uplatňují. Jedná se především o disperzní interakce, dipól-dipól interakce, indukční interakce nebo tvorbu vodíkových můstků. Pokud se jedná o extrakci v systému kapalina-kapalina, je hlavní podmínkou pro extrakci, aby se ustavila rovnováha mezi analytem a rozpouštědlem [91, 92].

V našem případě mají stanovované metabolity převážně nepolární charakter a vyskytují se v cytoplazmatické membráně a v ostatních buněčných organelách. V případě karotenoidních kvasinek disponujících silnou buněčnou stěnou, která je bariérou pro molekuly lipidů, je nutné pro úspěšnou extrakci lipidických látek nutné dezintegrovat buněčnou stěnu. U řas a sinic je rovněž nutné rozrušení buněk, ale extrakce je účinnější z důvodu tenčí buněčné stěny, která obsahuje velké množství vody. K rozrušení buněčné stěny se můžou použít mechanické, chemické a enzymatické metody [6, 93].

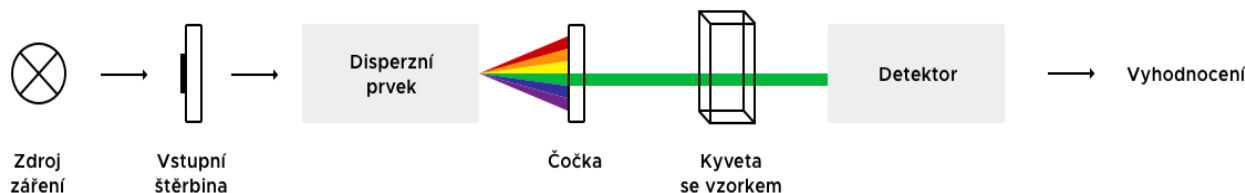
2.6.2 Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti

Základním principem spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti je absorpce záření vlnové délky 200 až 800 nm, kde nutnou podmínkou jsou zředěné roztoky molekul. Pokud dojde k absorpci molekulami roztoku, následně dochází k excitaci valenčních elektronů vyskytujících se v molekulových orbitalech [92].

Molekulová absorpční spektrometrie využívá stanovení látek na základě Lambert-Beerova zákona, kde absorbance je přímo úměrná koncentraci analytu absorbujícího záření a tloušťce absorbující vrstvy. Je nutné splnit podmínku zředěných roztoků, u kterých se molární koncentrace pohybuje do $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Z hlediska instrumentace je zdrojem záření především deuteriová výbojka pro ultrafialové oblasti a wolframová nebo wolframová-halogenová pokrývající oblast viditelného spektra. Pro obě oblasti se využívá xenonových výbojek. Dále následuje disperzní prvek, kde se nejčastěji využívá difrakční mřížka Czerny-Turner.

Následuje detekce záření, kde se využívá především fotonásobiče, fotodiody nebo diodového pole. Při měření je nutno brát v úvahu volbu vhodné kyvety.

Standardně se využívají kyvety křemenné umožňující stanovení již od vlnové délky 180 nm, dále skleněné a plastové kyvety, umožňující měření od 300 nm výše. V ultrafialové oblasti je nutná podmínka použití křemenné kyvety [92].



Obrázek 16. Schéma molekulové absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti

2.6.3 Chromatografické metody

Chromatografie je separační metodou využívající separaci složek na základě interakcí analytu mezi mobilní neboli pohyblivou fází a stacionární, nepohyblivou fází. Mobilní fáze může být, buď plynná nebo kapalná a stacionární fáze může být kapalná nebo pevná. Metoda se využívá jak ke kvantitativní, tak kvalitativní analýze vzorků.

Vzorek je na začátku analýzy umístěn na začátek stacionární fáze a následným pohybem mobilní fáze je vzorek unášen systémem. Vzorek může být v průběhu analýzy zadržován stacionární fází, a proto jsou více zadržovány vzorky poutající se silněji. Tímto způsobem se složky na základě interakcí se stacionární fází separují a látky méně zadržované putují systémem rychleji [92].

2.6.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

U vysokoúčinné kapalinové chromatografie je hlavním rozdílem oproti plynové chromatografii fakt, že zde dochází k interakci nejen se stacionární fází, ale i s fází mobilní. V průběhu analytické separace se tedy analyt dělí mezi fází stacionární a fází mobilní. Doba trvání, kterou analyt stráví v systému, je závislá na rozdílné afinitě k oběma fázím. Proto záleží na polaritě mobilní fáze, která ovlivňuje rovnováhu mezi analytem a stacionární fází. K získání optima je většinou nutné pracovat s gradientem složení mobilní fáze [91, 92, 93].

Hlavní výhodou kapalinové chromatografie je, že není potřebné převádět vzorky na těkavé sloučeniny a rovněž nedochází k tepelné degradaci, jako je tomu u plynové chromatografie. Vzhledem k tomu, že pro dokonalou separaci je nutné použít malé částice sorbentu, který klade odpor kapalině, je potřebné provádět analýzu při vysokém tlaku.

V první části systému se musí kapalina neboli mobilní fáze načerpat do systému pístovými nebo membránovými čerpadly. Pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii je nutno klást náročné požadavky na vhodné čerpadlo. Především z hlediska konstrukce se musí jednat o materiály odolné vůči korozi. Jsou vhodná čerpadla z nerezové oceli, titanu nebo z keramického materiálu. K těsnění se využívá především teflon, dále pro sedélka a ventily používáme safír.

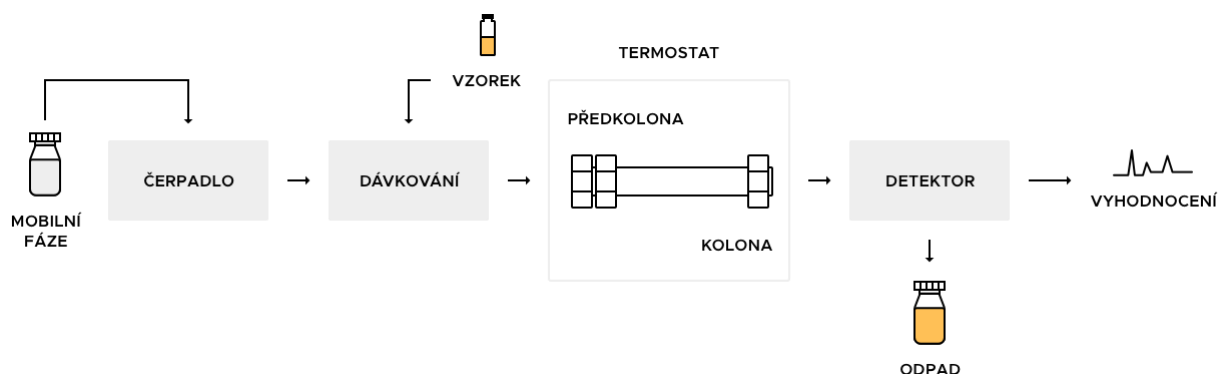
Hlavní podmínkou je zajištění dávkování kapaliny bez kolísání průtoků. Dále se musí vzorek do systému nadávkovat. Co se týče dávkování vzorků, tak konstrukční zařízení může ovlivnit účinnost separace. Dávkování se může provádět buď pomocí přímého nástřiku injekční stříkačkou na vrstvu sorbentu v koloně přes septum, kde nedochází k zastavení průtoku mobilní fáze, nebo naopak bez použití septa, kde je nutností přerušit tok mobilní fáze kolonou. Přestože je metoda přímého nástřiku jednoduchá, tak není vhodná pro kvantitativní analýzu. Dále lze vzorek dávkovat pomocí dávkovacího ventilu se smyčkou, kde nedochází k přerušování toku mobilní fáze mezi pumpou a kolonou.

Rychlým pootočením ventilu mobilní fáze se vytlačuje vzorek ze smyčky na kolonu. Smyčky patří mezi vyměnitelné části chromatografického systému a jejich objem se může lišit v rozmezí jednotek až po desítky mikrolitrů. Jako poslední se pro více vzorků využívá automatického dávkování, kde není nutnost kontinuální obsluhy přístroje. Hlavní požadavek pro dávkování je, aby vzorek byl dokonale rozpuštěn. Pokud jsou, ale ve vzorku přítomny tuhé částice, je nutné vzorek předem filtrovat. Nejlepší volba pro rozpuštění vzorků je rozpouštědlo se stejným složením jako mobilní fáze [92, 91, 93].

U vysokoúčinné kapalinové chromatografie najdeme pouze náplňové kolony. Pro různé analytické separace se využívají kolony různých délek, vnitřního průměru a náplně. Standardně se využívá pro zhotovení kolony nerezová ocel. Náplňový materiál se pohybuje od průměru částic 3 μm až 10 μm . Dále se před kolonu umísťuje předkolona sloužící jako ochrana před různými nečistotami a nerozpustnými materiály.

Většina stanovení probíhá při laboratorní teplotě, avšak při zvýšení teploty u některých separací dojde ke zlepšení dělení látek. K zajištění vhodné teploty kolony v průběhu separace slouží termostat.

K detekci analytu v kapalinové chromatografii se využívá kupříkladu fotometrických, fluorescenčních, refraktometrických a hmotnostních detektorů. Mezi nejčastější patří fotometrický detektor. Je založen na měření absorpance eluátu, který vytéká z kolony. Při optimální detekci analytu musí být dostatečná absorpční dráha průtočné květy, přes kterou prochází paprsek. Konstrukčně se může jednat o detektory měřící při jedné vlnové délce nebo u složitějších se může nastavit vlnová délka pomocí monochromátoru. Nejvíce se využívá PAD detektorů umožňujících snímat absorpční spektrum v určené oblasti vlnových délek bez nutnosti přerušení separace na koloně. Detektorem je pole s vysokým počtem fotodiód. Na Obrázek 17 je schéma kapalinového chromatografu [91, 92, 93].



Obrázek 17. Schéma kapalinového chromatografu

2.6.3.2 Plynová chromatografie

V plynové chromatografii je mobilní fází zpravidla inertní plyn a stacionární fází je kapalná látka zakotvená na nosiči nebo méně často se využívá povrchově aktivní adsorbent. Klíčovým mechanismem plynové chromatografie je interakce migrujících látek nesených nosným plynem kolonou se stacionární fází. Hlavní rozdíl oproti vysokoúčinné kapalinové chromatografii je, že nosný plyn neinteraguje s analytem, ale pouze unáší analyt systémem.

Na Obrázek 18 je znázorněno schéma plynového chromatografu. Jako první dojde k průchodu nosného plynu redukčním ventilem, kde dochází k redukci tlaku pod 0,5 MPa, dále plyn postupuje do sušící trubice a následně do regulátoru tlaku, kde se nastaví vstupní tlak do kolony. Analyt se dávkuje do proudu nosného plynu a je vnesený do chromatografické kolony. V samotné koloně probíhá separace vzorku. V dalším kroku jsou vzorky unášeny do detektoru, který zpracovává signál [91, 92, 93].

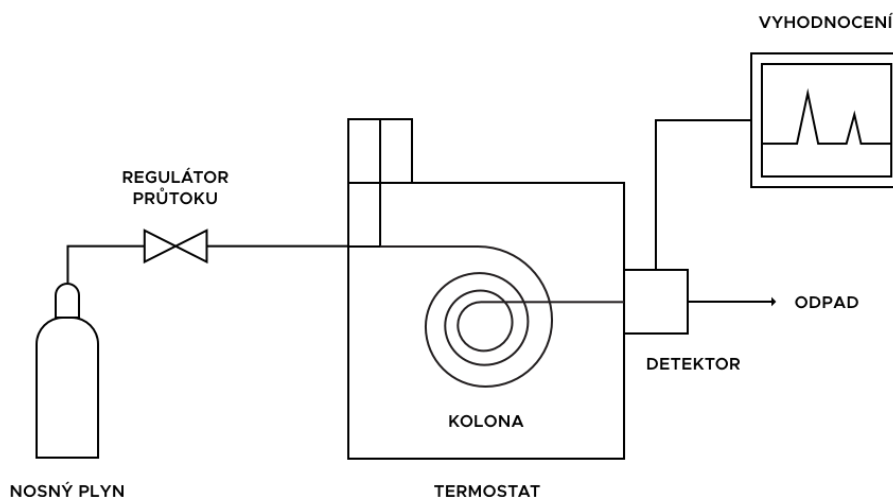
Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev, která obsahuje plyny jako vodík, dusík, helium nebo argon. Volba nosného plynu ovlivňuje mnoho faktorů. Nejčastěji to závisí na typu detektoru, dále se jedná o inertnost, čistotu, hustotu plynu a bezpečnost při samotné analýze. Pokud jde o fyzikální vlastnosti, nejvíce je sledována viskozita a hustota plynů, protože má vliv na difúzi a průtok nosného plynu. Použité nosné plyny musí mít vysokou čistotu. Případný obsah kyslíku by mohl oxidovat analyt nebo stacionární fázi a nevratně ji poškodit. Nežádoucí obsah kyslíku se odstraňuje katalyzátorem. V nosném plynu můžou být rovněž přítomné uhlovodíky ovlivňující detektor, které odstraňujeme sorpcí pomocí aktivního uhlí. Jako poslední je vlhkost, ta se odstraňuje na molekulovém síti [91, 92, 93].

Dalším důležitým parametrem je regulace tlaku a průtoku mobilní fáze, nosného plynu. Nejvíce se využívá regulace průtoku nosného plynu tak, že se vytvoří velký tlakový spád před kolonou, díky kterému jsou změny tlaku v koloně během samotné analýzy zanedbatelné. Regulační systém umožňuje buď stálý průtok, nebo pomocí programu mění průtok nosného plynu během analýzy. Pomocí elektronické regulace lze dosáhnout stanoveného průtoku i při rozdílné teplotě během analýzy [91, 92, 93].

Dále je nutno zavést vzorek do proudu nosného plynu. Hlavní podmínkou analytu je těkavost, dostatečná koncentrace a v průběhu dělení nesmí nastat tepelná degradace. Abychom dosáhli co nejužších elučních zón, je potřeba co nejrychleji provést nástřik do proudu nosného plynu. Pokud je vzorkem plyn, tak dávkování probíhá pomocí dávkovacích ventilů. V případě kapalin se dávkování provádí pomocí injekčních stříkaček přes septum ze silikonové gumy až do vyhřívací kolony, kde se promývá nosným plynem. V plynové chromatografii se nejčastěji využívá kapilárních kolon. Dávkování do kapilárních kolon je omezeno nižší kapacitou, tudíž nelze dávkovat velké objemy vzorků (pouze 0,1 až 10 μl). Díky tomu se u kapilárních kolon využívá dělič nástřiku. Probíhá to způsobem, že vzorek se nástříkne do vyhřívané dávkovací komory a následně z proudu zplyněného vzorku vstoupí do kolony pouze část vzorku. Nástřik lze provést i bez děliče toku. Je to vhodné pro relativně větší objemy kolem 0,5 až 5 μl . Využívá se stejného zařízení jako u děliče toku, pouze odvod děliče je uzavřen.

Další součástí chromatografického systému je detektor sloužící k detekci látek v nosném plynu. Hlavní požadavky, které musí detektor splňovat je, aby signál byl stabilní, reprodukovatelný a měl co nejnižší úroveň šumu. Dále musí být dodržena lineární závislost signálu na koncentraci v nejširším možném rozsahu koncentrací.

Mezi nejrozšířenější detektory patří ionizační detektory, kde můžeme zařadit například plamenově ionizační detektor (FID), fotoionizační detektor (PID) a detektor elektronového záchytu. Dále nemůžeme opomenout spojení s hmotnostním spektrometrem (MS) [91, 92, 93].

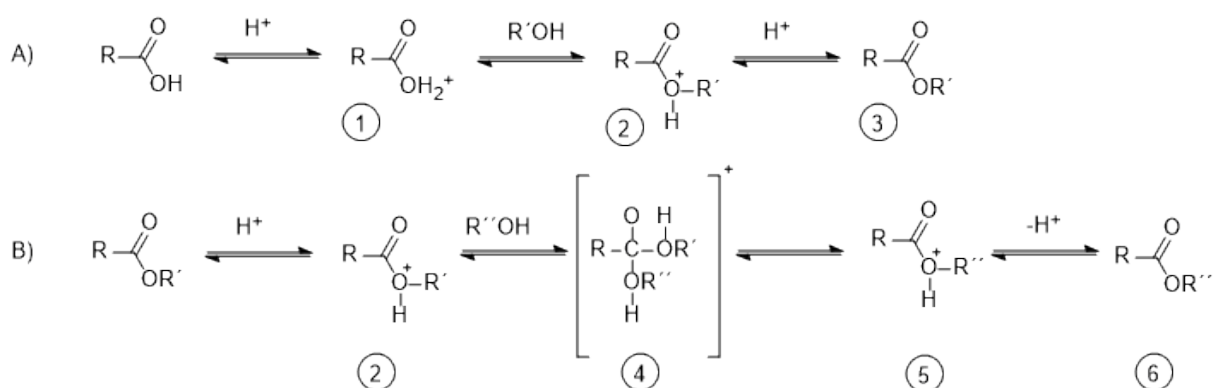


Obrázek 18. Schéma plynového chromatografu

2.6.3.3 Esterifikace a transesterifikace mastných kyselin

Obecně dochází k esterifikaci karboxylových kyselin (mastné kyseliny) alkoholy v přítomnosti vhodného kyselého katalyzátoru. Na schématu Obrázek 19 v reakci A je výchozím krokem reakce protonace kyseliny, kde následně dochází ke vzniku oxoniového iontu, který může reagovat ve výměnné reakci s alkoholem, čímž vzniká meziprodukt (2). Ten poté může ztratit proton, aby se stal esterem (3). Každý krok reakce je reverzibilní, ale v přítomnosti vysokého nadbytku alkoholu dochází ke konečné esterifikaci.

Dále je nutné provést samotnou transesterifikaci, která je znázorněná na Obrázek 19 v bodě B. Počáteční protonace esteru probíhá po přidání výměnného alkoholu za vzniku meziproduktu (4), který následně může být disociován přechodovým stavem (5) za vzniku esteru (6). Jako u esterifikace, tak i v tomto případě je každý krok reakce reverzibilní a v přítomnosti velkého nadbytku alkoholu dojde k produkci požadovaného esteru. Je nutné během transesterifikace zcela vyloučit vodu, která by mohla zapříčinit hydrolýzu disociací meziproduktu na volnou kyselinu (4) [95].



Obrázek 19. Schéma esterifikace a transesterifikace [95]

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je srovnání produkce vybraných metabolitů kvasinkami a řasami kultivovanými v podmínkách externího stresu. V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- literární rešerše zaměřená na druhy a produkci lipidických metabolitů pomocí kvasinek a řas
- kultivace vybraných druhů karotenogenních kvasinek a řas v podmínkách externího stresu (osmotický, světelný, teplotní)
- stanovení růstových a produkčních vlastností kvasinek a řas ve stresových podmínkách
- vyhodnocení vlivu stresu na produkci biomasy, karotenoidů, lipidů a dalších metabolitů.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie použité pro kultivaci kvasinek

D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner s r.o. (ČR)

Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)

Pepton z kaseinu, Roth (SRN)

Agar-agar, Roth (SRN)

4.1.2 Chemikálie použité pro kultivaci sinic a mikrořas

Dusičnan sodný p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Na₂-EDTA.2H₂O p.a., Sigma-Aldrich (SRN)

Chlorid železitý hexahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Kyselina sírová 96% p.a., Penta (ČR)

Síran železnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Kyselina boritá p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Chlorid manganatý tetrahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)

Molybdenan sodný dihydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)

Dusičnan kobaltnatý hexahydrát p.a., Sigma-Aldrich (SRN)

Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Chlorid zinečnatý p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Chlorid kobaltnatý hexahydrát p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

4.1.3 Chemikálie použité pro extrakce

Aceton p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

4.1.4 Chemikálie použité pro transesterifikaci a analýzu pro GC a pro HPLC

Methanol pro HPLC, Penta (ČR)

Kyselina heptadekanová pro GC, Sigma-Aldrich (SRN)

Hexan pro GC, Penta (ČR)

tris(hydroxymethyl)aminomethane p.a., Lach-ner, S.r.o. (ČR)

Acetonitril pro HPLC, Penta (ČR)

Ethylacetát pro HPLC, Penta (ČR)

Ostatní použití chemikálie byly vesměs čistoty p.a. a byly získány od běžných distributorů.

4.2 Přístroje a pomůcky pro kultivace

Spektrofotometr VIS, Helios δ, Unicam (GB)

Box Aura mini iBioTech (ČR)

Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)

GKB Color Digital CCD kamera (Tchaiwan)

Lucia Image active 5.0, Laboratory Imaging spol. s r.o. (ČR)

Třepačka Yellow line, (SRN)

Třepaný inkubátor, ZWYR-D2401 – Labwit, BioTech (ČR)

Centrifuga BioTech, (ČR)

Analytické váhy Boeco (SRN)

Kultivátor Multi-Cultivator MC 1000-OD PSI Drásov (ČR)

- Stojan pro 8 zkumavek o objemu 80 ml
- Termostat s vodní lázní,
- Vzduchová pumpa
- Zásobník na destilovanou vodu
- LED diodový zdroj pro každou zkumavku
- Detektor optické hustoty – detekce při 680 nm a 720 nm

4.3 Přístroje používané pro izolaci a analýzu vybraných metabolitů

Light meter, LX-1128SD (USA)

Lyofilizátor Labconco FreeZone 4.5 Freeze Dryer (USA)

Termoblok VWR, (ČR)

Vortex/homogenizátor disruptor Genie, Scientific Industries, Inc. (USA)

HPLC/PDA sestava: Sestava HPLC/MS (Thermo Fischer Scientific, USA)

- Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)
- Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR
- Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR
- Vyhodnocovací systém Xcalibur
- Kolona Kinetex Core Shell C18, 150 mm délka, 5,0 µm částice, Phenomenex
- Držák předkolony - KJ0 - 4282, ECOM (ČR)
- Předkolona - C18,AJ0 - 4287, Phenomenex
- Filtry pro HPLC, PRE-CUT, Alltech (GB)
- Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)
- Systém MicroTime 200, Picoquant GmbH, objektiv s vodní imerzí Olympus UPLSAPO 60XW

Thermo Scientific TRACE™ 1300 Gas Chromatograph, (Thermo Fischer Scientific, USA)

- Detektor FID (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Thermo Scientific AI 1310 Autosampler
- Kolona Zebron ZB-FAME, 30 m × 0,25 mm × 0,20 µm, Phenomenex

4.4 Použité kmeny mikroorganismů

4.4.1 Kmeny kvasinek

Rhodotorula glutinis CCY 20-2-26

Rhodotorula mucilaginosa CCY 19-4-6

Cystofilobasidium macerans CCY 10-1-2

Sporidiobolus pararoseus CCY 19-9-6

Xanthophyllomyces dendrorhous CCY 77-1

Všechny uvedené kmeny byly získány ze sbírky „Culture Collection of Yeasts“ Chemického ústavu SAV v Bratislavě.

4.4.2 Kmeny mikrořas

Scenedesmus obliquus CCALA 455

Scenedesmus dimorphus CCALA 443

Chlorella sorokiniana CCALA 260

Chlorella saccharophila CCALA 258

Botryococcus brauni CCALA 777

Desmodesmus acutus CCALA 437

Chlorella vulgaris CCALA 924

Desmodesmus quadricauda CCALA 463

4.4.3 Kmeny sinic

Arthrospira maxima CCALA 028

Synechococcus nidulans CCALA 188

Kmeny řas a sinic byly získány ze sbírky autotrofních mikroorganismů „Culture Collection of Autotrophic Organisms“ Botanického ústavu AV ČR v Třeboni.

4.5 Kultivace mikroorganismů

4.5.1 Kultivace karotenogenních kvasinek

Vybrané kmeny kvasinek *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cystofilobasidium macerans* a *Sporidiobolus pararoseus* byly kultivovány v tekutém živném médiu s aplikací stresových podmínek, kde se jednalo o různou koncentraci chloridu sodného, teploty, světelného záření a absenci světelného záření. Vzhledem k možnosti zvýšené sedimentace kvasinkových kmenů a potřebě aerace, byly baňky konstantně protřepávány při 120 otáčkách/min ve třepacím inkubátoru s volitelně nastavitelnou teplotou. Pro kultivaci byla zvolena teplota 10 °C, 15 °C, 20 °C a 25 °C, dále níže uvedené koncentrace chloridu sodného v Tab. 3 a kombinace světelného záření nebo absence světelného záření. Intenzita světelného záření byla stanovena pomocí luxmetru na hodnotu 400 lux. Média použité pro kultivaci kvasinek byly sterilovány v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 1 hodiny. Kultivace kvasinek má tři postupné etapy uvedené v dalších bodech.

4.5.1.1 Inokulum 1 a inokulum 2

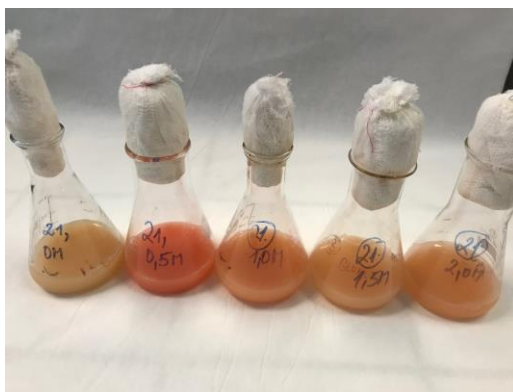
Pro každou kultivaci je nutné nejprve asepticky zaočkovat zásobní kulturu uchovávanou v kryozkumavkách na Petriho miskou s YPD agarem. Složení YPD agaru a inokula 1, 2 je uvedeno v níže uvedené Tab. 1. Následně kultura byla přeložena do termostatu při 25 °C a kultivována po dobu tří dnů. Další krok spočíval v přípravě inokula 1, kde v laminárním boxu bylo asepticky zaočkováno inokulum 1 v poměru 1 klička zásobní kultury na 10 ml objemu inokula 1. Poté bylo připraveno inokulum 2 tak, aby požadovaný poměr objemu inokula 1 a inokula 2 byl 1 : 5. Inokulum 1 bylo následně kultivováno po dobu 24 hodin a poté asepticky přeočkováno do inokula 2 v laminárním boxu v poměru 1 : 5.

Tab. 1. Složení YPD inokula, pevné YPD médium

| Složka | Koncentrace [g/l] |
|------------------------|-------------------|
| Bakteriologický pepton | 20,0 |
| Glukosa | 20,0 |
| Kvasničný autolyzát | 10,0 |
| Agar (pevné médium) | 20,0 |

4.5.1.2 Produkční médium

Dále bylo připraveno produkční médium viz složení níže Tab. 2, kde jako stresové podmínky byly zvoleny různé koncentrace chloridu sodného ve srovnání s kontrolním glukózovým médiem v závislosti na teplotě, osvětlení a absenci osvětlení. Do produkčního média bylo zaočkováno inokulum 2 v poměru 1 : 5. Kultivace v produkčním médiu probíhala po dobu 96 hodin.



Obrázek 20. Aplikace solného stresu na *Cystofilobasidium macerans*

Tab. 2. Složení glukózového média

| Složka | Koncentrace [g/l] |
|---|-------------------|
| KH_2PO_4 | 4,0 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,7 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 4,0 |
| Glukóza | 30,0 |

Tab. 3. Koncentrace chloridu sodného v produkčních médiích

| Chlorid sodný | Koncentrace [mol/l] |
|---------------|---------------------|
| | 0,0 |
| | 0,5 |
| | 1,0 |
| | 1,5 |
| | 2,0 |

4.5.2 Kultivace mikrořas a sinic

Kultivace mikrořas a sinic byla prováděna ve fotobioreaktoru neboli multikultivátoru, který slouží pro nízkoobjemové kultivace řas a sinic. Multikultivátor umožňuje kultivaci až osmi paralelně zapojených kultivačních zkumavek za současného vzdušnění. Dále disponuje vodní lázní, kde lze nastavit vyhřátí kultivačních zkumavek a intenzitu osvětlení jednotlivých zkumavek pomocí LED diod až do $1000 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. V rámci kultivace řasových a sinicových kultur se využívá inokulační a produkční médium o stejném složení. Média byla sterilována dvakrát v autoklávu po dobu 2 hodin.

Kultivace řasových kultur vyžaduje přípravu inokula, kdy zásobní kultury jsou zaočkovány z pevného média do inokulačního média. Po dostatečném nárůstu řasové nebo sinicové biomasy byla následně změřena absorbance inokula média při vlnové délce 680 nm a kultura byla přeočkována do produkčního média tak, aby se hodnota absorbance rovnala $A = 0,15$. Hodnota absorbance byla pro srovnání zvolena na základě předchozí diplomové prací [96].

4.5.2.1 Aplikace salinity a teplotního stresu

V tomto experimentu byl aplikován stres ve formě produkčního média s obsahem NaCl v koncentraci 0,5 mol/l, 1,0 mol/l, 1,5 mol/l a 2 mol/l a teploty 15 °C, 20 °C, 25 °C a 30 °C. Médium využívané pro kultivace všech řasových kmenů a sinice *Synechococcus nidulans* bylo BBM médium, složení je uvedeno v Tab. 6. Pro kultivaci kmene *Arthrospira maxima* se využívalo Spirulina médium se složením uvedeným v Tab. 4. Výše uvedené stresové podmínky byly použity pro kmeny mikrořas *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus dimorphus*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella saccharophila* a *Botryococcus brauni*.

V případě sinic se jednalo o *Synechococcus nidulans* a *Arthrospira maxima*. Do sterilních zkumavek bylo asepticky přidáno produkční médium a inokulum, aby výsledná absorbance (při vlnové délce 680 nm) byla $A = 0,15$ o objemu 80 ml. Připravené zkumavky následně byly vloženy do multikultivátoru s lázní vytemperovanou na požadovanou teplotu. Bylo nastaveno jednotné osvětlení pro všechny zkumavky na $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Kultivace z časových důvodů probíhala po dobu sedmi dnů. Paralelně byl růst kultury sledován pomocí softwaru OD view, který umožňuje sledovat optickou hustotu při vlnových délkách 680 nm a 730 nm. Kvůli vysoké sedimentaci řasových kultur byly do práce zařazeny pouze ukázkové růstové křivky – viz Obrázek 91, Příloha 1 a Příloha 2.

4.5.2.2 Aplikace světelného stresu

V dalším experimentu byl aplikován světelný stres na všechny výše uvedené kmeny řas a sinic. Jako produkční médium se využívalo pro řasy a sinice BBM médium a pro *Arthrospira maxima* bylo využito Spirulina médium. Příprava médií a očkování kultury do produkčních médií probíhala uvedeným způsobem v bodě 5.5.2.1. Připravené zkumavky byly vloženy do multikultivátoru s vytemperovanou lázní na 25 °C. Nejdříve bylo nastaveno jednotné osvětlení $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu 3 dnů a až poté intenzita pro jednotlivé zkumavky $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $600 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a $800 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Vzhledem k pomalému růstu řasových a sinicových kultur byl experiment prodloužen na 14 dnů. Při kultivaci byl paralelně sledován růst kultury pomocí softwaru OD view. Kvůli vysoké sedimentaci řasových kultur byly do práce zařazeny pouze ukázkové růstové křivky (solný stres).



Obrázek 21. Aplikace světelného stresu u kmenů *Chlorella sorokiniana* a *Scenedesmus dimorphus*

Tab. 4. Složení Spirulina média

| | Spirulina Solution 1 | Spirulina solution 2 |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|
| Složka | Koncentrace [g/l] | Koncentrace [g/l] |
| NaHCO ₃ | 22,70 | - |
| Na ₂ CO ₃ | 8,06 | - |
| K ₂ HPO ₄ | 1,00 | - |
| NaNO ₃ | - | 5,00 |
| K ₂ SO ₄ | - | 2,00 |
| NaCl | - | 2,00 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | - | 0,40 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | - | 0,08 |
| Roztoky | Koncentrace [ml/l] | Koncentrace [ml/l] |
| P-IV Metal Solution | - | 12,00 |
| Chu Micronutrient Solution | - | 2,00 |

Tab. 5. Složení části *Spirulina média*

| P-IV Metal Solution | | Chu Micronutrient Solution | |
|---|-------------------|---|-------------------|
| Složka | Koncentrace [g/l] | Složka | Koncentrace [g/l] |
| Na ₂ EDTA·2H ₂ O | 0,750 | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,020 |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | 0,097 | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,044 |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0,041 | CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0,020 |
| ZnCl ₂ | 0,005 | MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0,012 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0,002 | Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0,012 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0,004 | H ₃ BO ₃ | 0,620 |
| | | Na ₂ EDTA·2H ₂ O | 0,050 |

Tab. 6. Složení *BBM média*

| Složka | Koncentrace [g/l] | Složka | Koncentrace [g/l] |
|--------------------------------------|-------------------|---|-----------------------|
| NaNO ₃ | 0,750 | FeCl ₃ ·6H ₂ O | 5,82·10 ⁻⁴ |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,075 | Na ₂ -EDTA·2H ₂ O | 4,50·10 ⁻³ |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0,025 | MnCl ₂ ·4H ₂ O | 2,46·10 ⁻⁴ |
| NaCl | 0,010 | NaMoO ₄ ·2H ₂ O | 2,40·10 ⁻⁵ |
| KH ₂ PO ₄ | 0,175 | ZnCl ₂ | 3,00·10 ⁻⁵ |
| K ₂ HPO ₄ | 0,075 | CoCl ₂ ·6H ₂ O | 1,20·10 ⁻⁵ |

4.5.3 Ko-kultivace

V tomto experimentu byly vyzkoušeny kokultivace mikrořas a kvasinek. Použité kmeny kvasinek byly *Rhodotorula glutinis* a *Xanthophyllomyces dendrorhous*. V případě řas se jednalo o kmeny *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Desmodesmus acutus*, *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus obliquus*, *Synechococcus nidulans* a *Desmodesmus quadricauda*.

Jako základ pro řasovou kulturu bylo použito BBM médium, kde jako zdroj dusíku byla močovina (1,9 g/l). Do média byly poté přidány komponenty pro růst kvasinek. Jako zdroj uhlíku pro kvasinkové kmeny byl použit glycerol v koncentraci 30 g/l, dále pro zdroj fosforu fosforečnan vápenatý 4 g/l a zdroj hořčíku představoval síran hořečnatý heptahydrát (0,696 g/l). Kvasinková kultura byla zaočkována na A = 0,05 (při 680 nm) a řasová kultura byla zaočkována při A = 0,4 (při 680 nm). Kultivace byla provzdušňována a probíhala po dobu 5 dní, kde byl sledován nárůst kultury oproti kvasinkové kontrole. Jednalo se o pilotní experimenty, které budou předmětem dalších odborných prací.

4.5.4 Stanovení nárůstu biomasy a následné zpracování pro analýzy

Pro stanovení nárůstu kvasinkové biomasy, analýzu karotenoidů a dalších lipofilních metabolitů byla využívána lyofilizovaná forma. Jako první krok po kultivaci bylo odebráno 40 ml biomasy a následovala centrifugace při 5000 rpm po dobu 7 minut. Poté byl supernatant odlit a biomasa byla promyta demineralizovanou vodou a opětovně centrifugována. Po centrifugaci byl supernatant znovu odlit a biomasa byla kvantitativně převedena do předem zvážené mikrozkušavky typu Eppendorf, centrifugována při 10 000 rpm po dobu 30 sekund a zbavena supernatantu. V následujícím kroku byly vzorky s biomasou lyofilizovány po dobu 24 hodin a poté byly uloženy v mrazícím boxu do další analýzy. Stanovení nárůstu biomasy bylo stanoveno gravimetricky v g/l.

V případě řasové a sinicové biomasy se postupovalo obdobným postupem uvedeným v předchozím odstavci, jen s rozdílem většího odběru média pro centrifugaci, vzhledem k nižším nárůstům. Dále centrifugace řasových a sinicových kultur probíhala při 7000 rpm až 8000 rpm po dobu 10 minut.

4.6 Izolace a analýza karotenoidů a dalších lipidických látek

Karotenoidy, ergosterol, koenzymy Q jsou látky lipofilní povahy nacházející se v kvasinkách, které jsou extrahovatelné pomocí organických rozpouštědel. K analýze byla použita lyofilizovaná biomasa z produkčních médií. V případě řasové biomasy se jednalo o chlorofyly, xanthofyly, karoteny, fytosteroly a koenzymy Q.

4.6.1 Izolace karotenoidů a dalších lipidických metabolitů

Do mikrozkušavky typu Eppendorf bylo odváženo přibližně 20 mg lyofilizované biomasy kvasinek. K biomase následně bylo přidáno 50 µl až 100 µl demineralizované vody a biomasa byla ponechána po dobu 1 hodiny rehydratovat. Pro účinnější extrakci byla biomasa vložena do mrazicího boxu po dobu 30 minut, kde působením nízké teploty došlo k porušení buněk a lepší extrahovatelnosti intracelulárních metabolitů. Poté k rehydratované biomase byl přidán 1 ml acetonu a skleněné kuličky v přibližně čtyřnásobném množství objemu biomasy. Mikrozkušavka byla umístěná do vortexu a protřepávána po dobu 15 minut. Dále byl aceton odpipetován do centrifugační zkumavky o objemu 15 ml a k biomase byl přidán 1 ml aceton pro opětovnou extrakci. V dalším kroku byly acetonové fáze spojeny, skleněné kuličky promyty dalším 1 ml acetonu. Acetonový extrakt byl odpařen na vakuové odparce a následně rozpuštěn v ethylacetátu HPLC kvality. V konečném kroku byl vzorek přefiltrován a převeden do vialky o objemu 1,8 ml a uložen do mrazicího boxu pro analýzu pomocí HPLC.

U řas a sinic se postupovalo stejným způsobem, s výjimkou menšího množství navážené biomasy v rozmezí 5 až 15 mg.

4.6.2 Analýza karotenoidů a dalších lipidických metabolitů pomocí HPLC

Analýza karotenoidů, ergosterolu a koenzymů Q u kvasinek probíhala pomocí HPLC sestavy od firmy Thermo Fischer Scientific na nepolární koloně C18 od firmy Kinetex. V případě karotenoidů u kvasinkové biomasy byla analyzována koncentrace torularhodinu, torulenu, β-karotenu a celkové karotenoidy. Další lipofilními metabolity, které byly stanoveny, jsou ergosterol a koenzym Q.

Samotná chromatografická analýza probíhala na nepolární koloně C18 v gradientovém módu uvedeném v Tab. 7. o složení mobilních fází viz Tab. 8. Průtok mobilní fáze byl v průběhu analýzy nastaven na 1000 µl/min a termostat udržován na teplotu 25 °C. Analýza probíhala po dobu 19 minut. Následná detekce vybraných metabolitů byla provedena spektrofotometricky s využitím PDA detektoru. Detekce byla nastavena pro vlnové délky, které odpovídají absorpčnímu maximu studovaných látek. V případě prvního kanálu snímajícího oblast 455 nm až 445 nm, která odpovídá absorpčnímu maximu karotenoidů, ale lze odečíst rovněž i chlorofyly. V UV oblasti při 285 nm absorbují steroly a koenzymy Q.

V případě řas a sinic se kromě karotenoidů, fytosterolů koenzymů Q analyzovaly také chlorofyly A a chlorofyly B. Z karotenoidů byly stanoveny především xanthofyly jako, neoxanthin, violaxanthin, lutein a z karotenů byl stanoven β-karoten. Analýza u řasových a sinicových kultur byla prodloužena na 25 minut.

Všechna data byla vyhodnocena z předem změřených kalibračních křivek jednotlivých dostupných standardů. Celkové karotenoidy jsou v našem případě součtem neidentifikovatelných karotenoidů a identifikovatelných karotenoidů. Neznámé karotenoidy byly kvantifikovány na kalibrační závislost β-karotenu. Vzhledem ke skutečnosti, že řasy produkují velké množství fytosterolů a standardy by byly velmi finančně náročné, tak tyto metabolity byly kvantifikovány na ergosterol, díky velmi podobné chemické struktuře [89].

Tab. 7. *Eluční gradientový program pro analýzu kvasinkové biomasy*

| Kvasinky | | | Řasy a sinice | | |
|-----------|----------|----------|---------------|----------|----------|
| Čas [min] | MF A [%] | MF B [%] | Čas [min] | MF A [%] | MF B [%] |
| 0 | 100 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 10 | 0 | 100 | 13 | 0 | 100 |
| 14 | 0 | 100 | 19 | 0 | 100 |
| 15,3 | 100 | 0 | 20 | 100 | 0 |
| 19 | 100 | 0 | 25 | 100 | 0 |

Tab. 8. *Složení mobilní fáze*

| | |
|--|-------------|
| Mobilní fáze A | Poměr |
| Acetonitril : methanol : trisHCl pufr (pH=8) | 84 : 2 : 14 |
| Mobilní fáze B | Poměr |
| Methanol : ethylacetát | 60 : 40 |

4.6.3 Transesterifikace vzorku mikrobiální biomasy

Nejdříve je nutné připravit transesterifikační směs obsahující 15% H_2SO_4 v methanolu HPLC kvality s přidavkem interního standardu kyseliny heptadekanové v koncentraci 0,5 mg/ml. Poté je do krimpovací vialky naváženo přibližně 10 mg lyofilizované mikrobiální biomasy. Následně se k biomase přidá 1,8 ml transesterifikační směsi. Připravené vzorky se zakrymplují, promíchají a inkubují v termobloku po dobu 2 hodin při 85 °C. Po proběhnutí transesterifikace jsou vzorky volně ochlazeny na laboratorní teplotu.

V dalším kroku se do vialek o objemu 4 ml napipetuje 0,5 ml 0,05 mol/l NaOH a do ní se kvantitativně převede obsah vialky se vzorkem. Dále se přidá 1 ml hexanu, vialka se uzavře a ponechá třepat na vortexu po dobu 5 min. Po oddělení fází se z organické fáze s methylestery mastných kyselin odebere 0,1 ml a převede do čisté vialky s 0,9 ml hexanu. V této fázi je vzorek připraven na analýzu pomocí GC.

4.6.4 Analýza lipidů pomocí GC

Vzorky obsahující methylestery mastných kyselin jsou poté analyzovány pomocí plynového chromatografu Scientific TRACE™ 1300 Gas Chromatograph s automatickým dávkováním vzorků s děličem toku.

Chromatografická analýza probíhala na kapilární koloně Zebron ZB-FAME. Následná detekce analytů byla provedena pomocí plamenově ionizačního detektoru. Chromatografická analýza probíhala za níže uvedených podmínek v Tab. 9 a Tab. 10.

Tab. 9. *Teplotní program analýzy*

| Retenční čas [min] | Gradient teploty [°C/min] | Cílová teplota [°C] | Čas zdržení teploty [min] |
|--------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|
| 0 | - | - | - |
| 1 | 0 | 80 | 1 |
| 5 | 15 | 140 | 0 |
| 21,7 | 3 | 190 | 0 |
| 25,5 | 25 | 260 | 1 |
| 25,5 | STOP | - | - |

Tab. 10. *Parametry analýzy plynovým chromatografem*

| | |
|--|--|
| Kapilární kolona | Zebron ZB-FAME, o rozměrech 30 m × 0,25 mm × 0,20 μm |
| Dávkování | Autosampler Thermo Scientific AI 1310 |
| Objem nástřiku vzorku | 1 μl |
| Poměr nástřiku děliče toku | 10 |
| Konstantní průtok nosného plynu H ₂ | 1 ml/min |
| Detektor | Plamenově ionizační |
| Teplota | 250 °C |
| Průtok | Vzduch 350 ml/min, make-up N ₂ 30 ml/min, H ₂ 35 ml/min |

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Kvasinky

V tomto experimentu byly kultivovány kmeny kvasinek *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cystofilobasidium macerans* a *Sporidiobolus pararoseus*. Zvolené stresové podmínky jsou teplota, koncentrace chloridu sodného, přítomnost a absence světelného záření. Sledován byl hlavně nárůst biomasy v g/l a koncentrace vybraných lipofilních metabolitů. Jako další byla pozorována akumulace lipidů v závislosti na výše uvedených podmínkách.

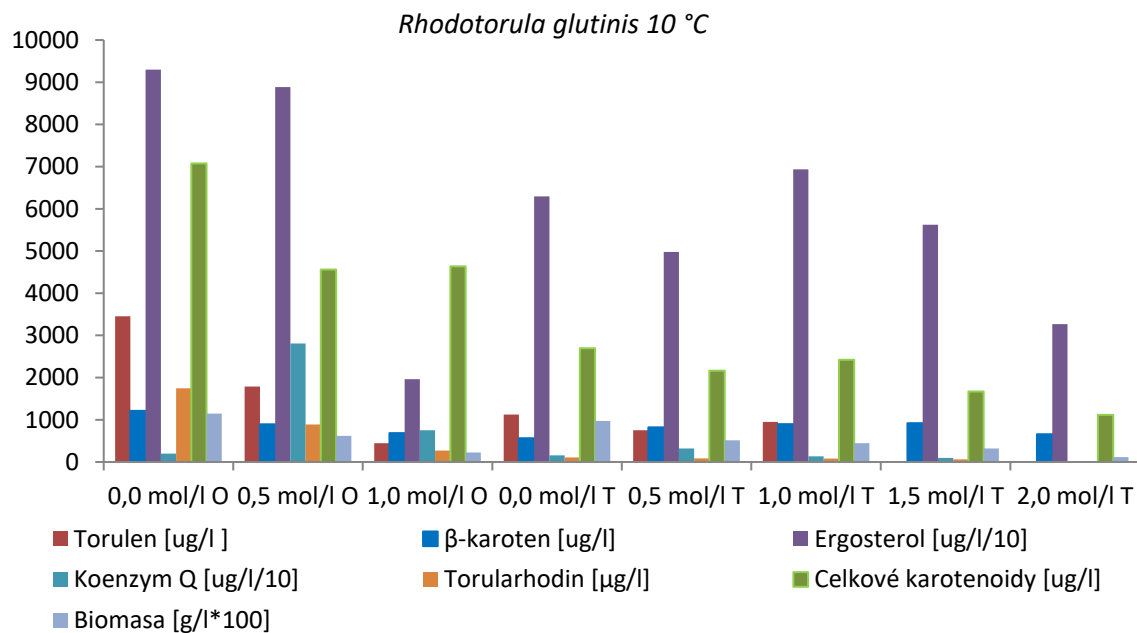
5.1.1 Kmen *Rhodotorula glutinis*

5.1.1.1 Aplikace teploty 10 °C

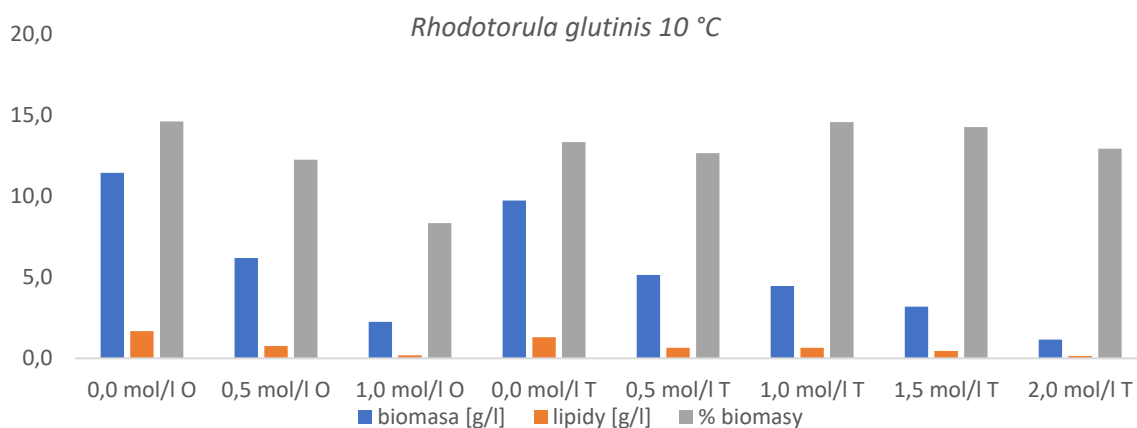
V tomto experimentu byl sledován nárůst biomasy a jednotlivých metabolitů při 10 °C v závislosti na koncentraci NaCl, osvětlení a jeho absenci. Celkové nárůsty a koncentrace jednotlivých metabolitů jsou zobrazeny v grafickém znázornění (Obrázek 22). V případě produkčního média s 2 mol/l NaCl došlo k letálnímu účinku, kde buňka pravděpodobně nedokázala udržet tak vysoký osmotický stres a nízkou teplotu. Z grafu je viditelný snižující se trend produkce s rostoucí intenzitou solného stresu, teploty, osvětlení a tmy. Pokud jde o porovnání světla a absence světla, tak světelné záření mělo pozitivní vliv na produkci sledovaných metabolitů. Můžeme soudit, že světelné záření indukuje tvorbu nejenom karotenoidů, ale i růst kultury a dalších lipofilních metabolitů.

Co se týče nárůstu biomasy, tak nejvyšší byla při kontrolním médiu bez přídavku NaCl, kde obsah činil 11,45 g/l. Jak si můžeme povšimnout, biomasa při absenci světelného záření poklesla přibližně o 15 % na hodnotu 9,74 g/l. Kontrolní médium při osvětlení (7,1 mg/l) produkovalo přibližně o 62 % více celkových karotenoidů oproti absenci osvětlení. Produkce konkrétních karotenoidů torulenu a torularhodinu měla sníženou tendenci s přídavkem NaCl. V případě absence osvětlení došlo k velmi nízké produkci torulenu a torularhodinu. Koncentrace ergosterolu měla obdobný trend jako výše uvedené karotenoidy, kde nejvyšší hodnota je v kontrolním glukózovém médiu pod světelným zářením (93 mg/l). Při osvětlení a aplikaci 0,5 mol/l NaCl koncentrace ergosterolu klesla pouze přibližně o 4 %. Produkce koenzymu Q byla indukována solným stresem v nízké koncentraci 0,5 mol/l, kde zvýšení pozorujeme u obou prostředí. Maximální výtěžek byl při osvětlení (0,5 mol/l NaCl), a to 28 mg/l.

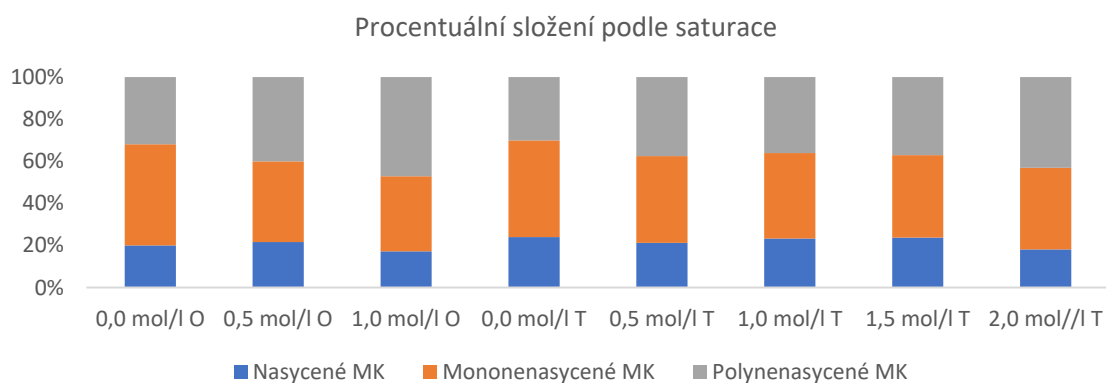
Při analýze lipidů viz grafické znázornění (Obrázek 23) bylo zjištěno, že kmen vykazoval sníženou produkci lipidů při osvětlení (vyjma kontrolního média) a při aplikaci solného stresu. Naopak, při kultivaci ve tmě a s přídavkem NaCl docházelo ke zvýšené akumulaci lipidů ve srovnání s kontrolou. Nejvyšší obsah se pohyboval u produkčního média s koncentrací 1,0 mol/l NaCl (tma) s 14,58 % lipidů v biomase a u kontrolního média při osvětlení s obsahem 14,62 % lipidů v biomase. Stres vedl ke zvýšené tvorbě polynenasycených mastných kyselin (dále PUFA).



Obrázek 22. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 10 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodotorula glutinis*



Obrázek 23. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 10 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodotorula glutinis*



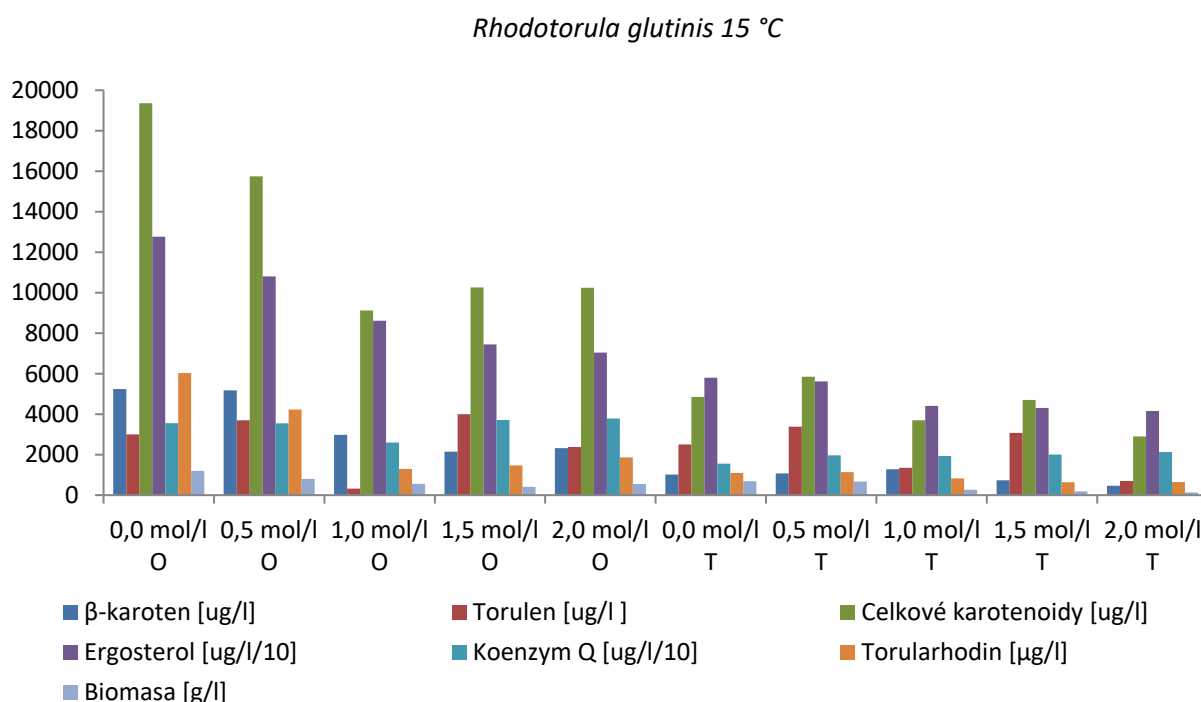
Obrázek 24. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace při teplotě 10 °C

5.1.1.2 Aplikace teploty 15 °C

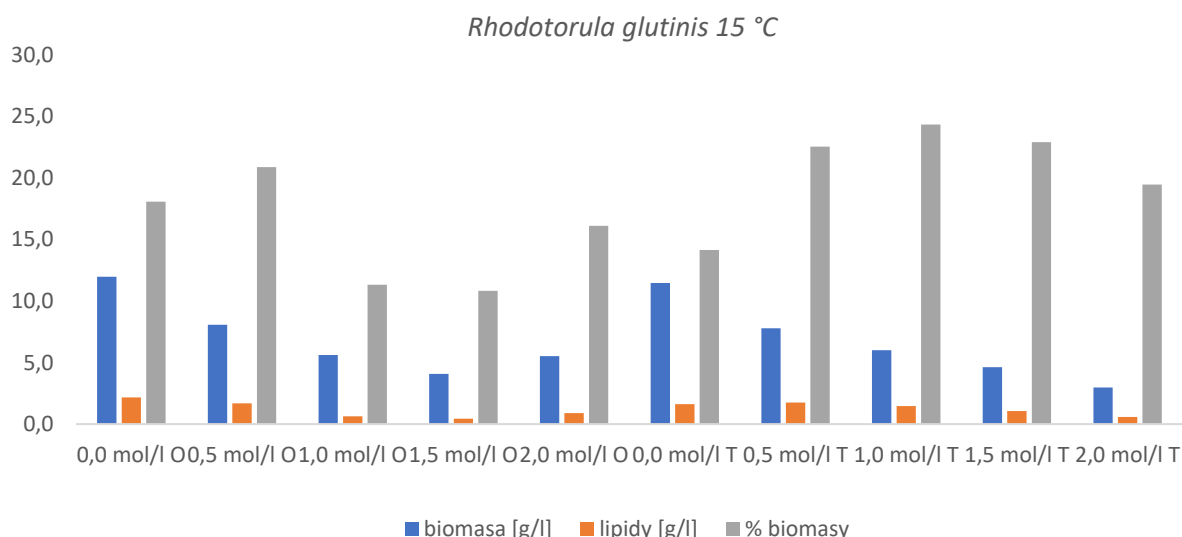
V dalším experimentu byl kmen *Rhodotorula glutinis* kultivován při teplotě 15 °C za stejných podmínek. Z grafického znázornění (Obrázek 25) vidíme, že nárůst biomasy a téměř všech ostatních metabolitů vykazuje klesající tendenci vlivem rostoucího osmotického stresu.

V případě absence světla docházelo ke zpomalení nárůstu až o 42 % oproti kontrolnímu médiu vystavenému světelnému záření. Z grafického znázornění (Obrázek 25) je zřetelné, že ačkoli přidavek chloridu solného má negativní účinek na produkci celkových karotenoidů, tak v médiu 0,5 mol/l a 1,5 mol/l NaCl lze pozorovat zvýšenou produkci torulenu za obou podmínek. Můžeme předpokládat, že určité hodnoty osmotického stresu mohou měnit aktivity biosyntetické dráhy pro produkci torulenu. Pokud se zaměříme na produkci koenzymu Q, tak lze pozorovat velmi jemný zvyšující se trend produkce se solným stresem téměř u všech koncentrací. Z experiment prováděných za tmy je viditelný rapidní pokles produkce. Maximální produkce koenzymu Q byla pozorována při 2,0 mol/l NaCl s 37,8 mg/l.

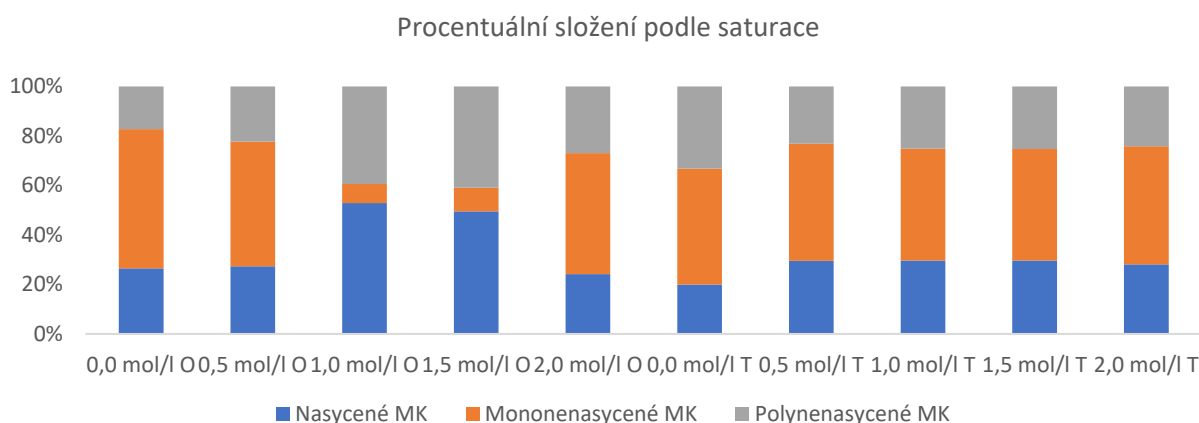
Ostatní metabolity dosahovaly nejvyšší hodnoty u kontrolního média při osvětlení s výtěžkem celkových karotenoidů 19,4 mg/l β -karotenu 5,2 mg/l a ergosterolu 127,6 mg/l. Z níže uvedeného grafu (Obrázek 26) lze usuzovat, že kmen vystaven světelnému záření vykazoval nižší produkce lipidů. Byla potvrzena skutečnost, že buňky mohou akumulovat zvýšené množství lipidů nebo karotenoidů. Vyšší výtěžky lipidů jsou pozorovány v kontrolním glukózovém médiu a při aplikaci 0,5 mol/l NaCl. Další koncentrace NaCl působily na buňky inhibičně, ale pokud se zaměříme na graf (Obrázek 27), vidíme zde, že dochází ke zvýšené syntéze PUFA. Je zajímavé, že ve tmě kvasinky změnilly aktivity své biosyntetické dráhy a zvyšovaly akumulaci lipidů oproti kontrolnímu glukózovému médiu při 1 mol/l NaCl až o 41,9 %.



Obrázek 25. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 15 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodotorula glutinis*



Obrázek 26. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 15 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodotorula glutinis*

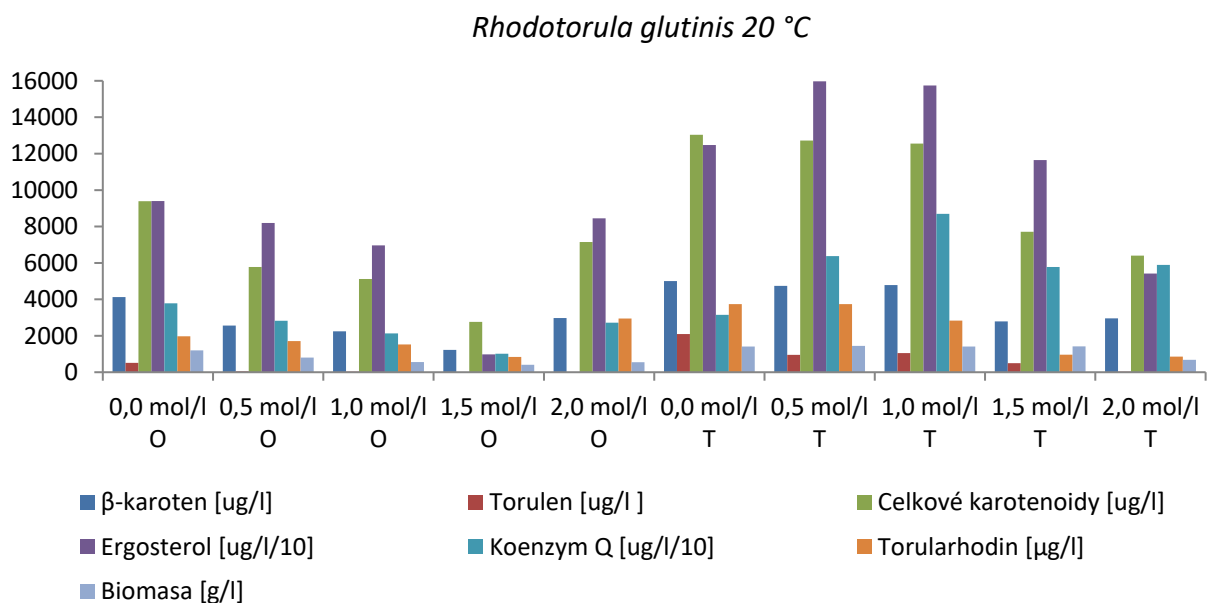


Obrázek 27. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace při teplotě 15 °C

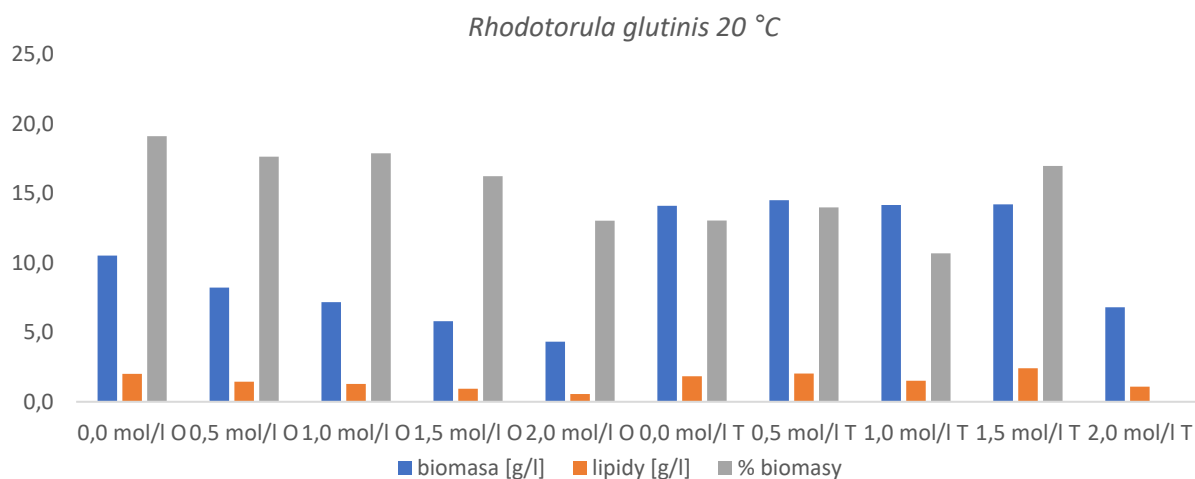
5.1.1.3 Aplikace teploty 20 °C

Z grafického znázornění (Obrázek 28) vyplývá, že při aplikaci 20 °C v podmínkách kultivace za tmy kvasinky vykazovaly zvýšený růst, ale také produkci jednotlivých metabolitů. Vzhledem k tomu, že experiment za osvětlení a za tmy nebyl kultivován paralelně, tak mohlo dojít k lepšímu/horšímu nárůstu inokula. Výsledek je velmi zajímavý a mohl by být předmětem dalších studií. Při osvětlení vidíme snižující se produkci biomasy a rovněž všech metabolitů téměř u všech vzorků vlivem zvyšujícího se osmotického stresu. Za tmy osmotický stres do koncentrace 1,0 mol/l NaCl přispíval k indukci zvýšené biosyntézy. Nejvyšší koncentrace všech metabolitů byly pozorovány u 0,5 mol/l a 1,0 mol/l NaCl, kde celkové karotenoidy dosahovaly 12,7 mg/l, ergosterol 160 mg/l, torulen 10,53 mg/l, torularhodin 3,7 mg/l, β -karoten 4,7 mg/l a koenzym Q 87 mg/l.

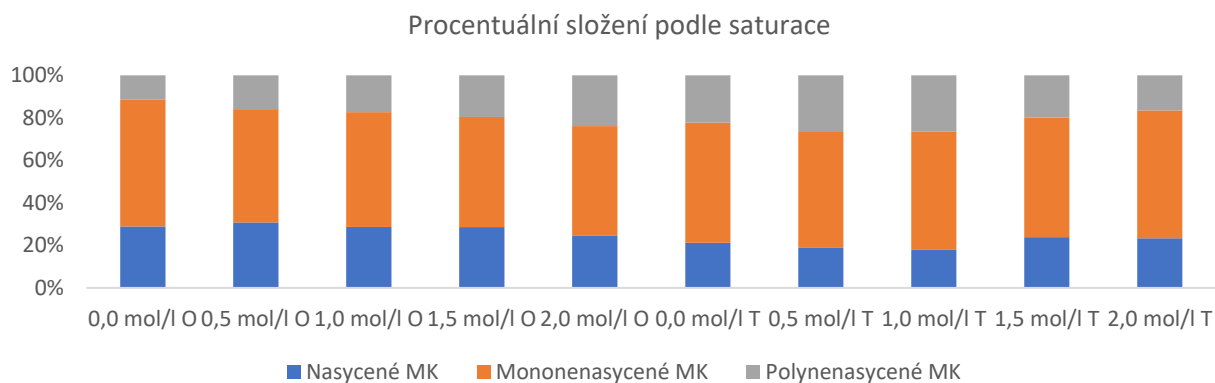
U akumulace lipidů byl pozorován obdobný trend jako u výše zmíněných metabolitů (Obrázek 29). Nejvyšší produkci lipidů vykazovalo kontrolní médium při osvětlení až 19 % biomasy. Rovněž zde pozorujeme, viz (Obrázek 30), že se snížením tvorby lipidů se mění profil mastných kyselin spíše směrem k vyššímu zastoupení PUFA.



Obrázek 28. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 20 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodotorula glutinis*



Obrázek 29. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 20 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodotorula glutinis*

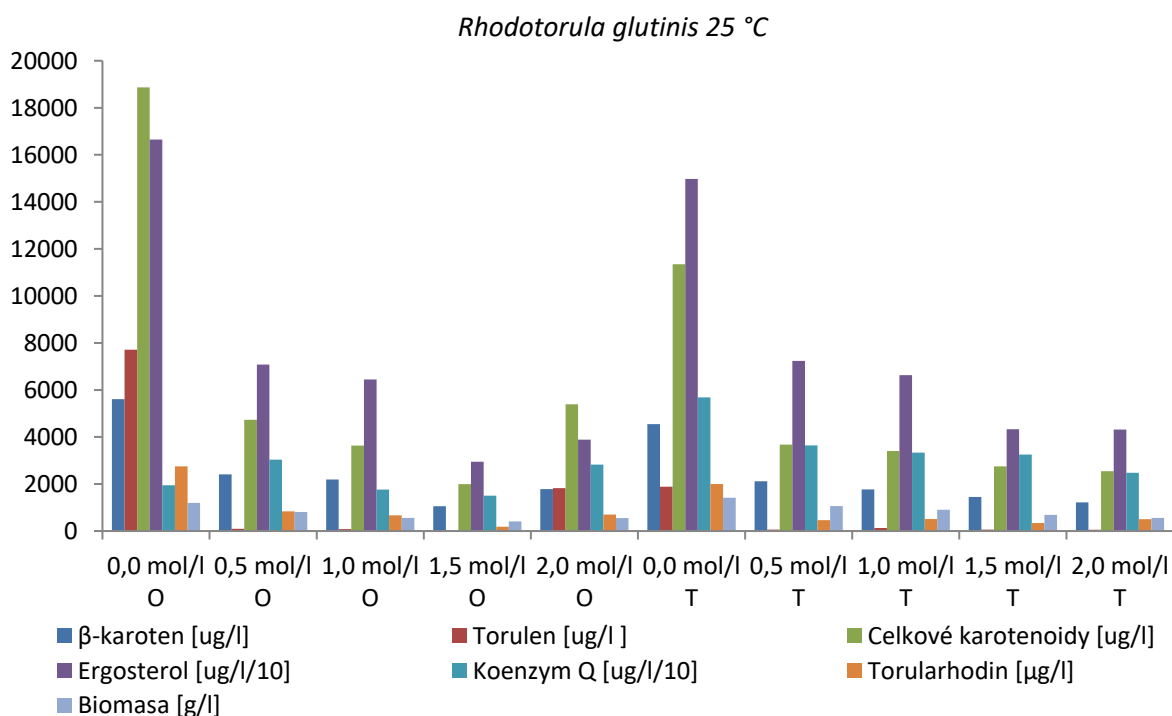


Obrázek 30. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace při teplotě 20 °C

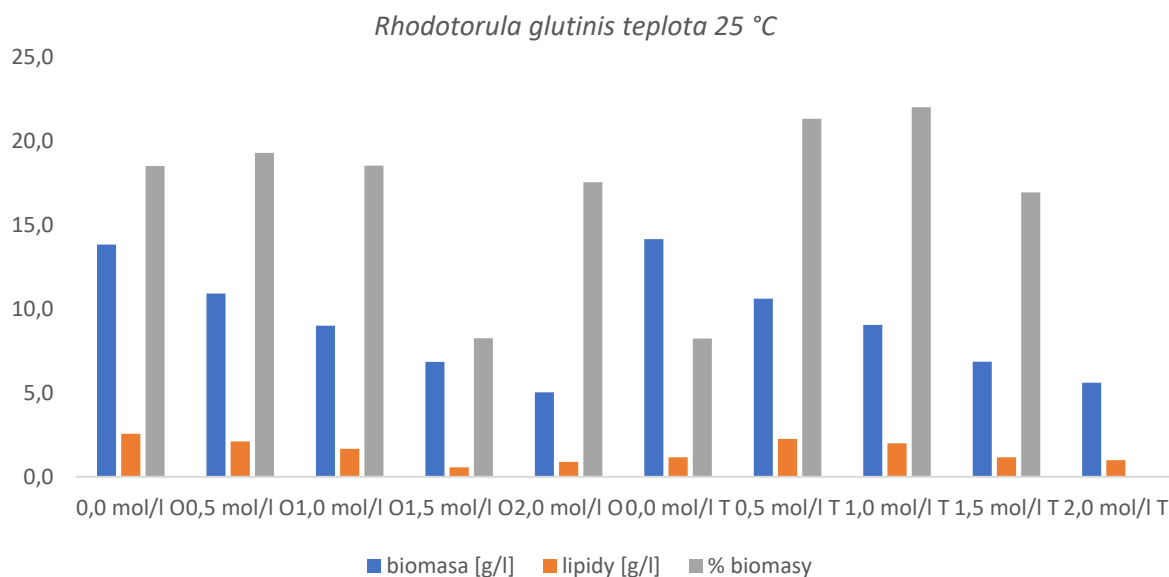
5.1.1.4 Aplikace teploty 25 °C

Při teplotě 25 °C je na první pohled z grafického znázornění (Obrázek 31) patrné, že při osvětlení a zvyšujícím se solném stresu dochází k rapidnímu poklesu produkce všech metabolitů. Jak se předpokládalo, tak absence osvětlení a souběžný osmotický stres vykazuje inhibiční efekt na produkci karotenoidů a dalších metabolitů. Nejvyšší produkce vybraných metabolitů jsou u kontrolního média při osvětlení (celkové karotenoidy 18,9 µg/l, torulen 7,7 µg/l, torularhodin 2,7 µg/l, β-karoten 5,6 µg/l, ergosterol 166,5 µg/l). Ačkoli tma měla negativní efekt na tvorbu metabolitů, tak v případě koenzymu Q docházelo k nárůstům až do koncentrace 57 µg/l.

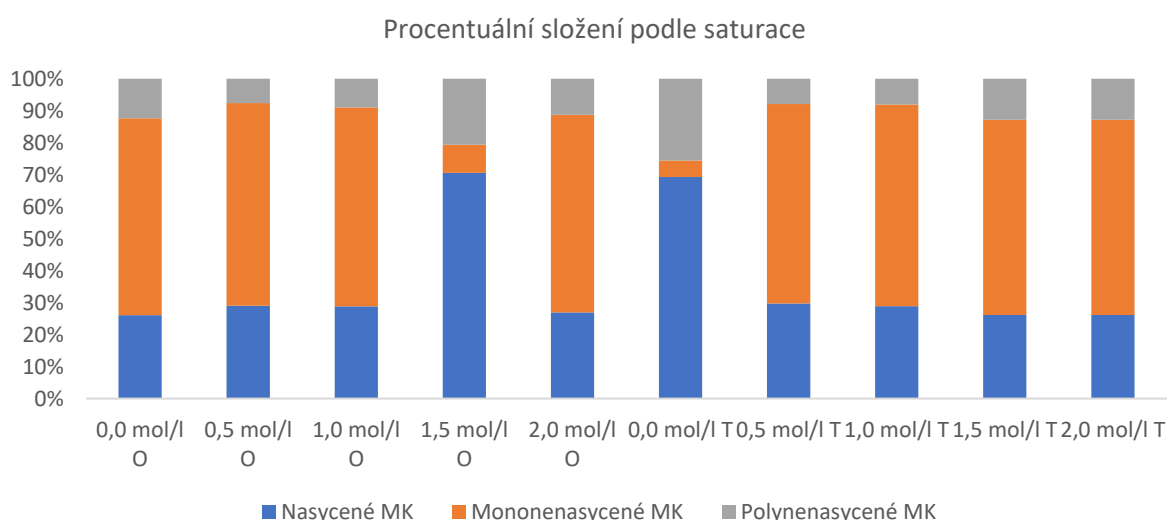
Akumulace lipidů u kmene *Rhodotorula glutinis* při teplotě 25 °C je znázorněná v grafu (Obrázek 32). Při osvětlení nepozorujeme extrémní změnu obsahu lipidů v závislosti na osmotickém stresu, vyjma kultury s 1,5 mol/l NaCl, kde tato koncentrace měla inhibiční efekt. Za tmy jsou výsledky pozoruhodné, zvýšený osmotický stres až do 1,0 mol/l NaCl nutí buňky ke zvýšené produkci lipidů až o 52 % oproti kontrole. Nejvyšší dosažená akumulace je 22 % lipidů v biomase u osmotického stresu v produkčním médiu s 1,0 mol/l NaCl (tma) a z hlediska výtěžnosti lipidů na g/l média při osvětlení u kontroly (2,6 g/l). V tomto případě není viditelný jednotný trend z hlediska nasycenosti MK v buňkách (viz Obrázek 33).



Obrázek 31. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 25 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodotorula glutinis*



Obrázek 32. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 25 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodotorula glutinis*



Obrázek 33. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace při teplotě 25 °C

5.1.1.5 Porovnání aplikace stresových faktorů u kmene *Rhodotorula glutinis*

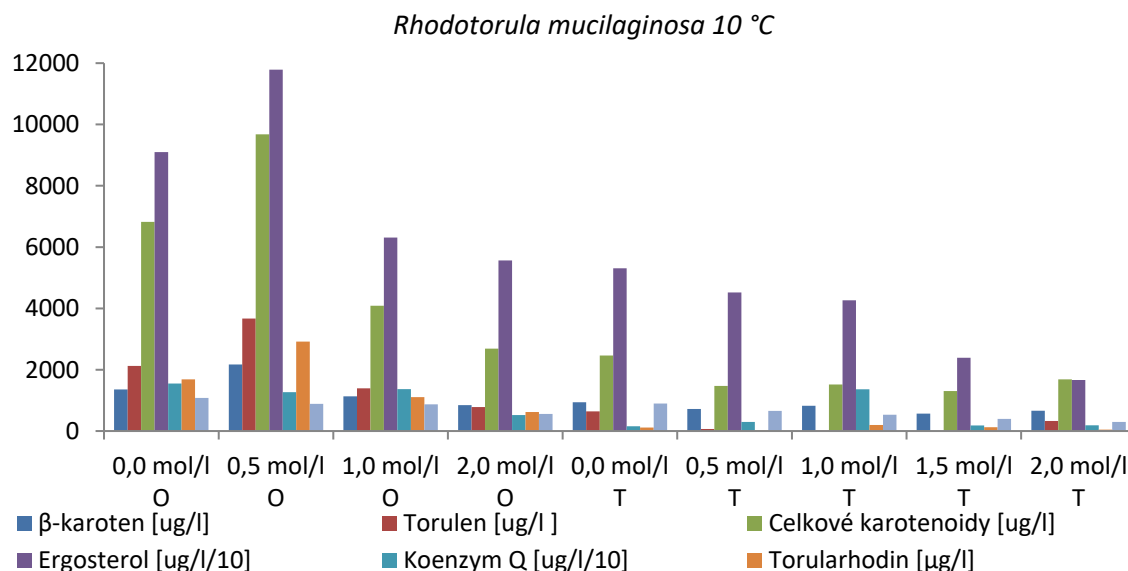
Nejoptimálnější podmínky pro růst kultury je teplota 20 °C až 25 °C, kde biomasa dosahovala v některých případech až 14,5 g/l. Zvýšená produkce celkových karotenoidů byla pozorována u kontrolních médií při 15 °C a 25 °C (osvětlení), která se pohybovala kolem 19 mg/l. Nejvyšší výtěžky torulenu (7,7 mg/l), torularhodinu (2,7 mg/l) a β -karotenu (5,6 mg/l) byly pozorovány při 25 °C (osvětlení). Nejlepší procentuální obsah lipidů v biomase byl nalezen při 15 °C ve tmě při 1,0 mol/l NaCl, kde se pohyboval kolem 24 % biomasy. V případě výtěžku celkových lipidů v g/l se optimální vhodné podmínky zdají být při 25 °C u kontrolního média (osvětlení). Při této koncentraci docházelo ke zvýšené akumulaci koenzymu Q (157 mg/l).

5.1.2 Kmen *Rhodotorula mucilaginosa*

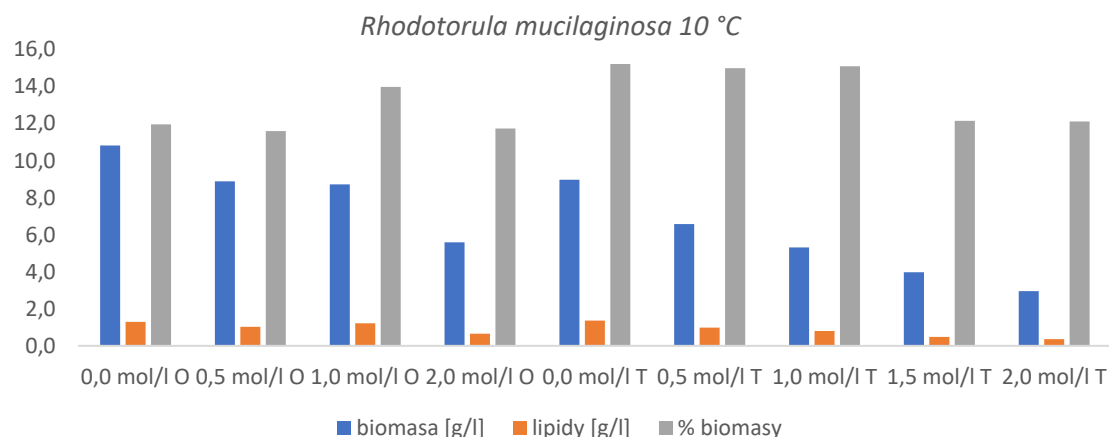
5.1.2.1 Aplikace teploty 10 °C

Na grafu (Obrázek 34) lze vyčíst snižující se trend téměř všech pozorovaných metabolitů vlivem rostoucího osmotického stresu. Jak je viditelné, tak při 0,5 mol/l NaCl (osvětlení) je závislost porušena (vyjma nárůstu biomasy) a dochází ke zvýšené produkci všech metabolitů. Můžeme usoudit, že nízká koncentrace chloridu sodného má pozitivní vliv pro syntézu vybraných metabolitů. Nejvyšší výtěžky celkových karotenoidů se pohybují kolem 9,7 mg/l, dále torulenu 3,6 mg/l, torularhodinu 2,9 mg/l, β -karotenu 2,2 mg/l, ergosterolu 118 mg/l a koenzymu Q 15,5 mg/l.

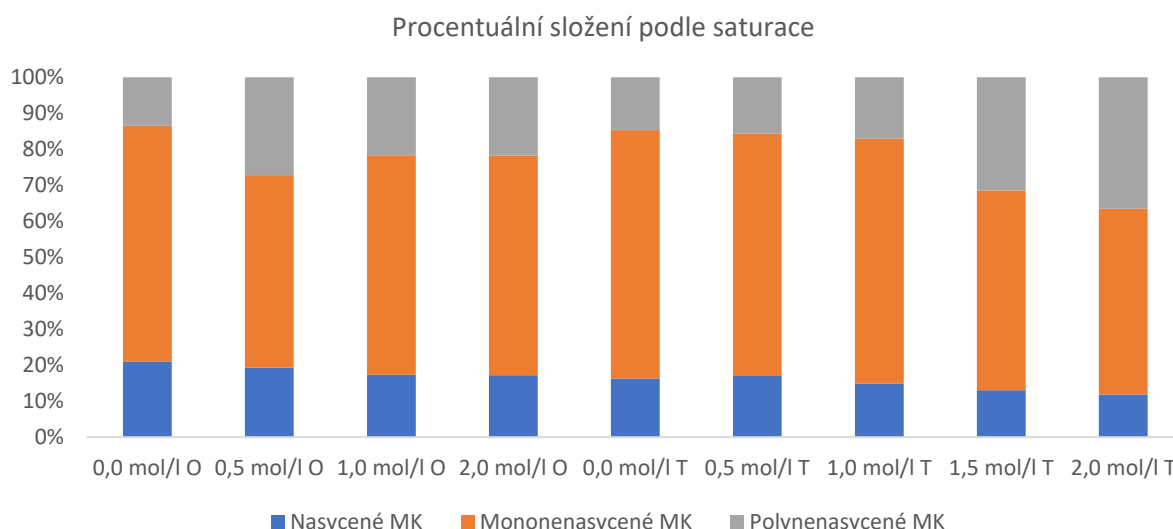
Z grafu (Obrázek 35) produkce lipidů můžeme vidět hlavní rozdíl ve zvýšené indukci v prostředí bez světla. Ve tmě pozorujeme, že solný stres nemá inhibiční účinek pro akumulaci lipidů až do koncentrace 1,5 mol/l NaCl, kde dochází k inhibici a indukci produkce PUFA (Obrázek 36). Naopak se zvýšeným osmotickým stresem při osvětlení dochází ke zvýšené syntéze především MUFA.



Obrázek 34. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 10 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodotorula mucilaginosa*



Obrázek 35. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 10 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodotorula mucilaginosa*

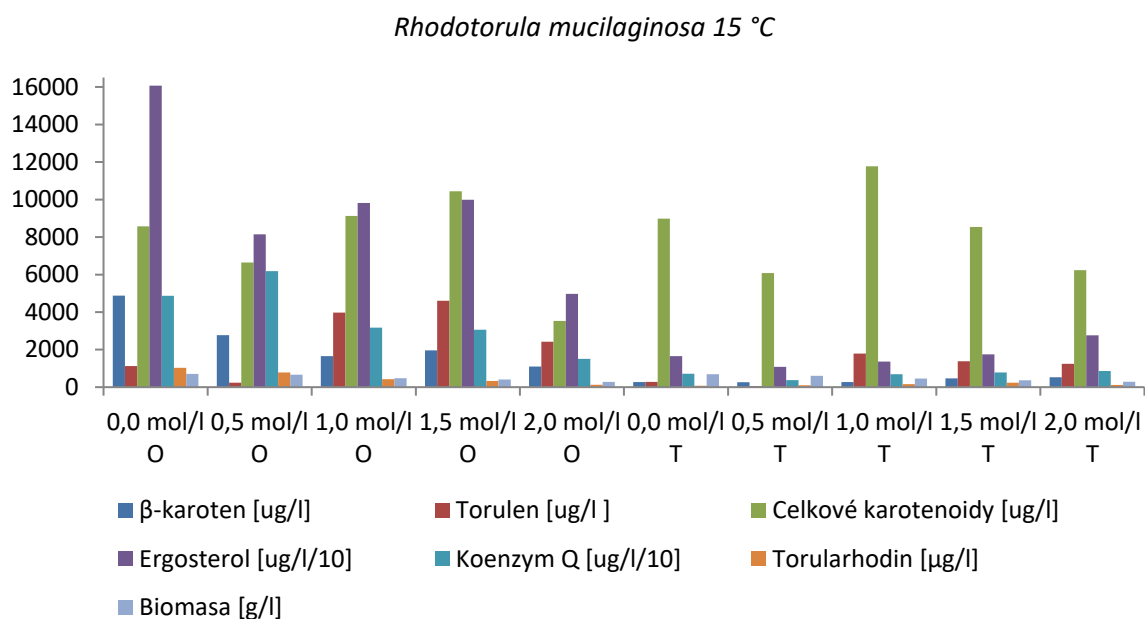


Obrázek 36. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace při teplotě 10 °C

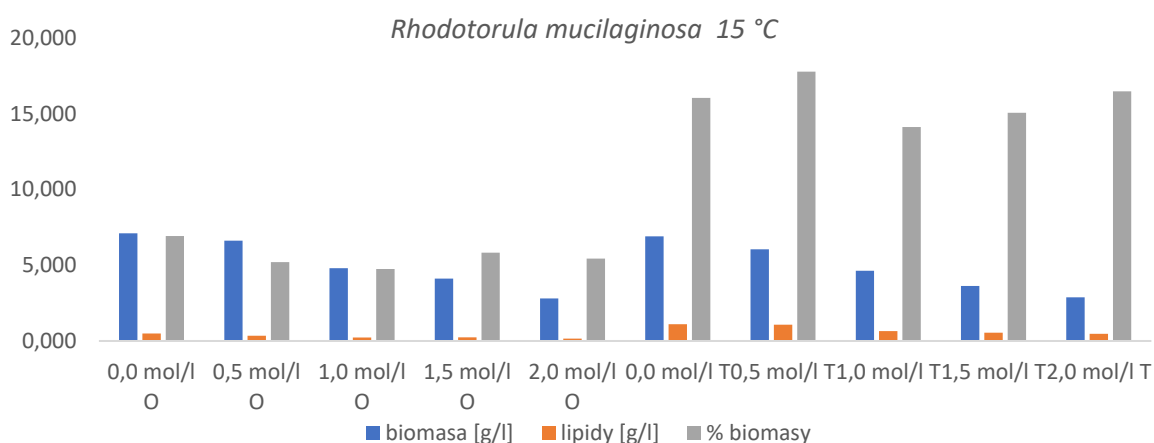
5.1.2.2 Aplikace teploty 15 °C

Z grafického znázornění (Obrázek 37) při 15 °C kultivace kmene *Rhodotorula mucilaginosa* je patrná zvýšená tendence produkce sledovaných metabolitů při aplikaci solného stresu. Při osvětlení dochází k mírnému navýšení produkce při 0,5 mol/l a 2,0 mol/l. Pokud jde o osvětlení, jsou zde přítomny markantní rozdíly v produkci ergosterolu (nejvyšší výtěžek 0,0 mol/l 160 mg/l) oproti temnu. Vzhledem k tomu, že kultivace nebyla očkovaná paralelně ze stejného inokula, tak lze předpokládat rozdílnost stavu výchozí kultury. Tento efekt by mohl být předmětem dalších prací. Další zajímavostí v případě kultur vystavených světlu je efekt zvýšené tvorby torulenu při 1,0 mol/l NaCl (3,9 mg/l) a 1,5 mol/l NaCl (4,6 mg/l). Naopak syntéza β -karotenu se přidavkem chloridu sodného snižuje (nejvyšší výtěžek 4,9 mg/l). Koenzym Q při osvětlení dosahuje maxima při slabém osmotickém stresu, kde vrchol produkce se pohybuje okolo 61,8 mg/l

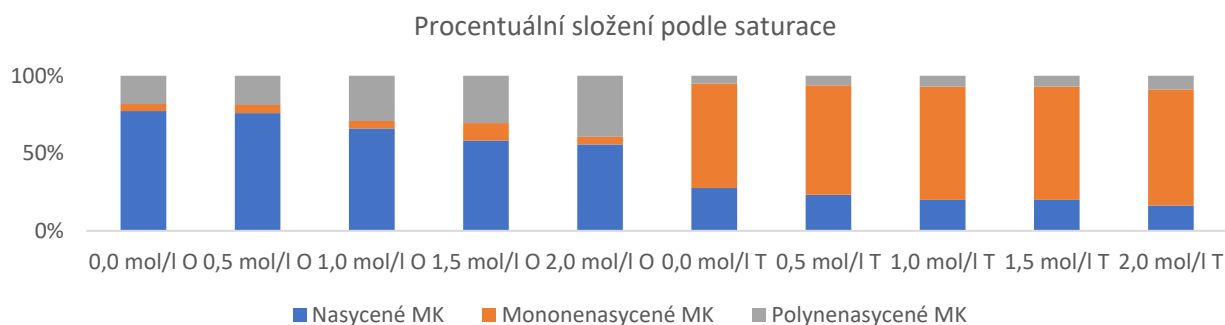
Produkce lipidů měla významný efekt u kultury nevystavené světelnému záření (Obrázek 38). U lipidů kultura vykazuje dvou až třináásobný nárůst produkce oproti světlu. Pokud srovnáme profil nasycenosti mastných kyselin (Obrázek 39), vidíme, že při temnu se zvyšuje především obsah MUFA vlivem osmotického stresu. V případě světla docházelo k produkci především SFA a přidavek NaCl měl pozitivní efekt na produkci PUFA. Nejvyšší dosažený výtěžek lipidů v biomase je 17,8 % při indukci 0,5 mol/l NaCl v temnu. Jestliže porovnáme graf, který zobrazuje lipidy s grafem zobrazujícím karotenoidy a další lipofilní metabolity, vidíme jednoznačnou souvislost. Jak již bylo uvedeno výše, buď se syntetizují karotenoidy, další lipofilní metabolity nebo lipidy.



Obrázek 37. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 15 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodotorula mucilaginosa*



Obrázek 38. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 15 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodotorula mucilaginosa*



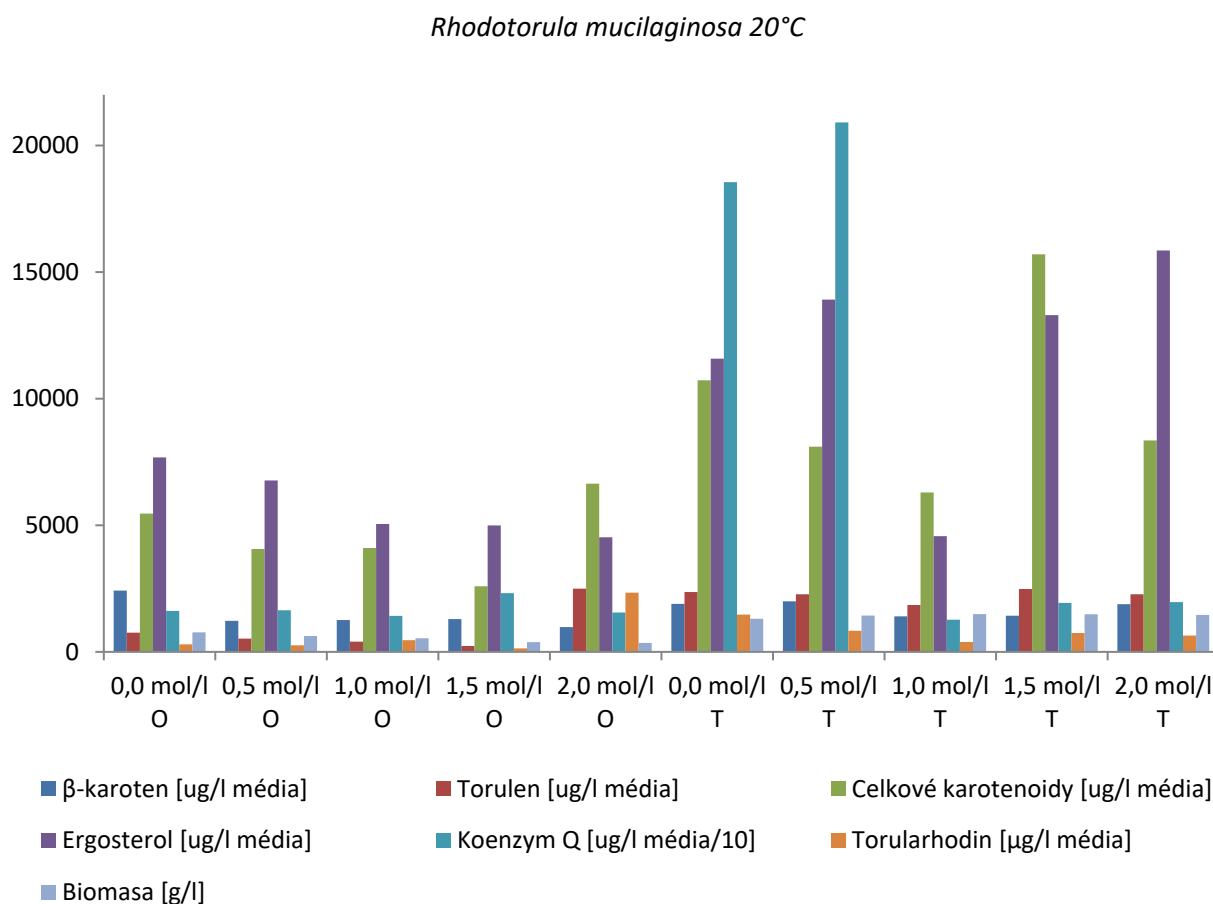
Obrázek 39. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace dle saturace při teplotě 15 °C

5.1.2.3 Aplikace teploty 20 °C

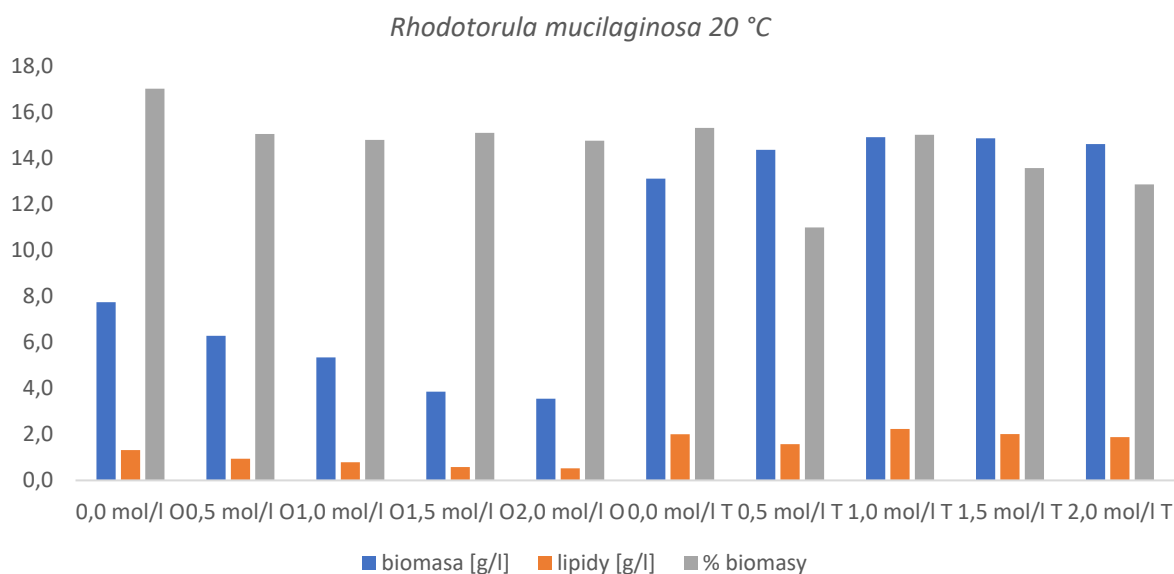
V grafu (Obrázek 40) je patrný mírný pokles produkce vlivem osmotického stresu. Porovnáme-li produkci vybraných metabolitů při světle a temnu, pozorujeme zvýšenou produkci za temna. Můžeme usuzovat, že teplota 20 °C a absence světla může být induktorem pro zvýšenou syntézu některých metabolitů (13,1 g/l biomasy, 11 mg/l celkových karotenoidů, 2,4 mg/l torulenu, 2,0 mg/l β -karotenu, 1,3 mg/l torularhodinu u kontrolního média za temna). Experiment nebyl očkován ze stejného inokula, tedy mohlo se stát, že výchozí kultura nebyla ve stejném stavu. Zvláštností je, že v temnu a přidavkem chloridu sodného nedocházelo k výraznému vlivu na růst buněk.

Produkce ergosterolu vykazovala inhibiční efekt vlivem chloridu sodného, ale v případě kombinace temna a chloridu sodného docházelo k indukci jeho produkce (nejvyšší výtěžek při 2,0 mol/l 158 mg/l). Co se týče koenzymu, z grafického znázornění vidíme rapidní produkce při tmě u kontrolního média (185 mg/l) a slabému osmotickému stresu 0,5 mol/l (až 209 mg/l).

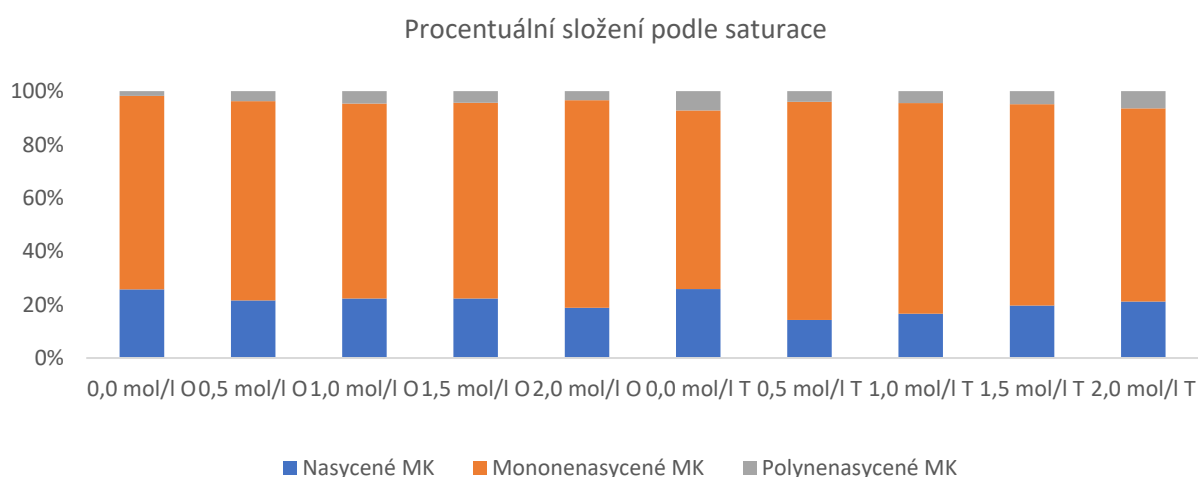
Akumulace lipidů je shrnuta v grafu (Obrázek 41). Pozorujeme, zde velmi slabý inhibiční efekt při zvýšeném osmotickém stresu. Nejvyšší procentuální obsah v biomase se pohyboval u kontrolního média (světlo) 17 %, ačkoliv maximální výtěžnost lipidů 2,24 g/l je zjištěna u produkčního média s 1,0 mol/l NaCl ve tmě.



Obrázek 40. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 20 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodotorula mucilaginosa*



Obrázek 41. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 20 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodotorula mucilaginosa*

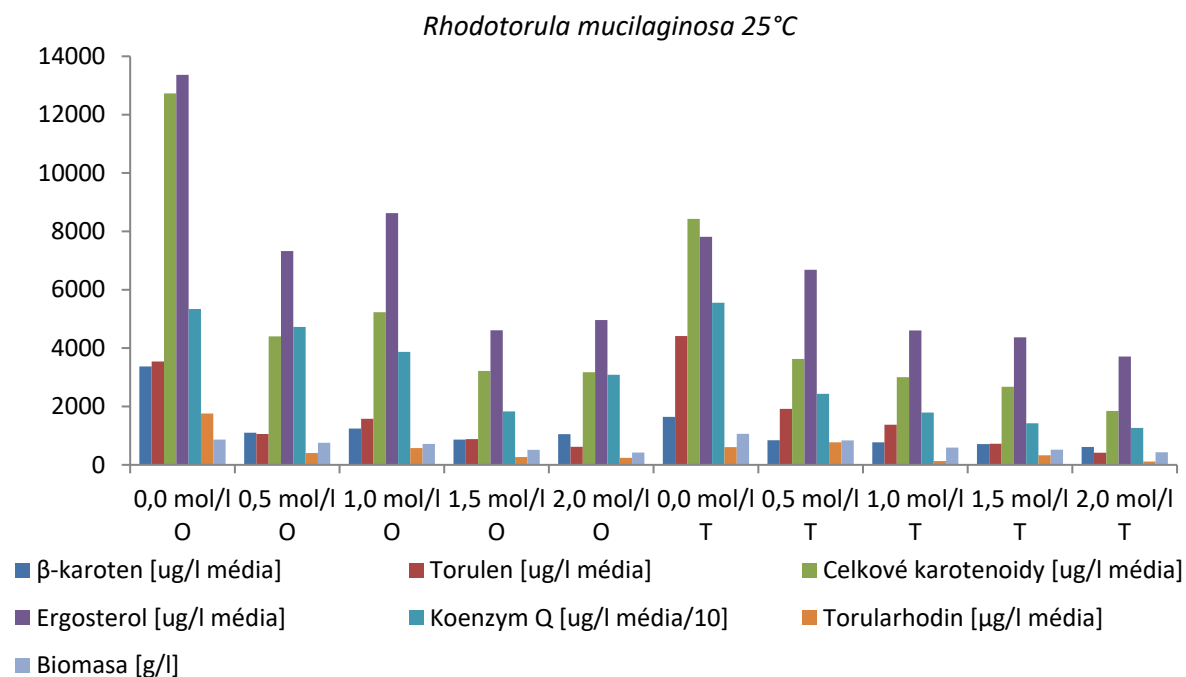


Obrázek 42. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace dle saturace při teplotě 20 °C

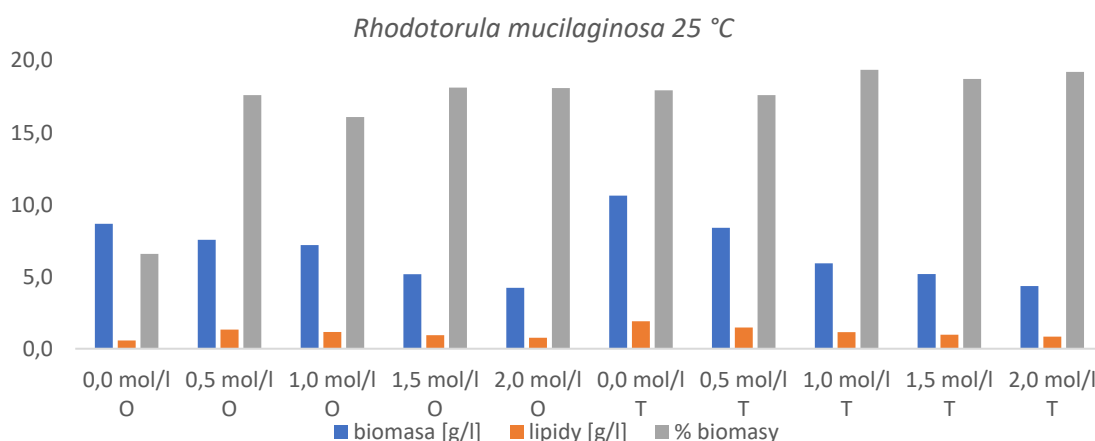
5.1.2.4 Aplikace teploty 25 °C

Z grafu (Obrázek 43) produkce karotenoidů a ostatních metabolitů je viditelný rapidní pokles při aplikaci chloridu sodného. Je zřetelné, že zvýšená teplota indukuje jejich syntézu. Prostředí bez světelného záření indukovalo růst, ale naopak inhibovalo syntézu karotenoidů a dalších metabolitů. Nejvyšší zastoupení žádaných metabolitů sledujeme u kontrolního média při osvětlení, kde celkové karotenoidy se pohybují kolem 12,7 mg/l, ergosterol 133 mg/l, torularhodin 1,8 mg/l a β -karoten 3,4 mg/l. Pokud porovnáme kontrolní médium při osvětlení a jeho absenci, vidíme zvýšenou produkci torulenu 4,4 mg/l a koenzymu Q 55,5 mg/l při tmě.

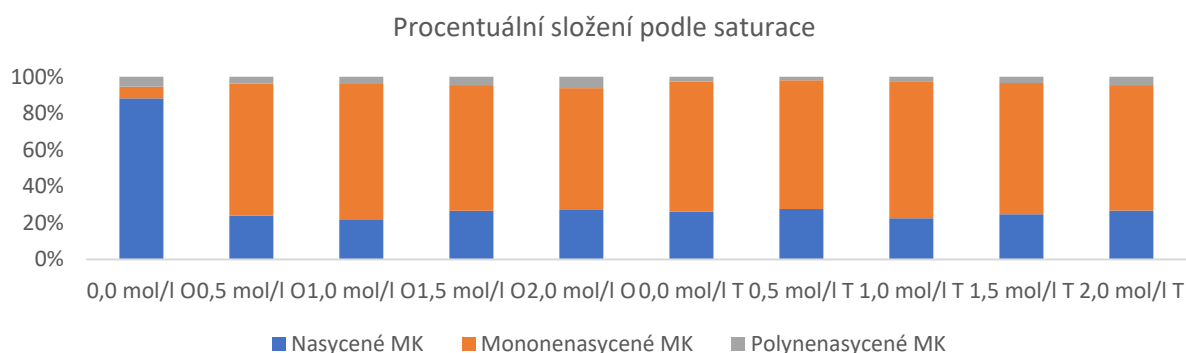
Z grafu (Obrázek 44) vidíme, že na procentuální zastoupení lipidů v biomase má pozitivní efekt zvýšený osmotický stres a temno, kde maximum se pohybuje při 19,3 % u koncentrace 1,0 mol/l NaCl (tma). Nejvyšší výtěžnost lipidů byla zaznamenána u vzorku s nejvyšším nárůstem biomasy 2 g/l (kontrolní médium, temno).



Obrázek 43. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 25 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodotorula mucilaginosa*



Obrázek 44. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 25 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Rhodotorula mucilaginosa*



Obrázek 45. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace při teplotě 25 °C

5.1.2.5 Porovnání aplikace stresových faktorů u kmenu *Rhodotorula mucilaginosa*

Z hlediska produkce karotenoidů se jako neoptimálnější teplota jeví 25 °C, kde výtěžky celkových karotenoidů narůstaly až do 13,4 mg/l média. Pokud zhodnotíme nárůsty kultury, tak nejvíce převládá kultura vystavena 20 °C v temném prostředí. V případě ergosterolu maximální produkce byly při 15 °C 160,7 mg/l u kontroly za světla. Předpokládáme, že buňky byly vlivem teploty stresované a indukovaly syntézu sterolů.

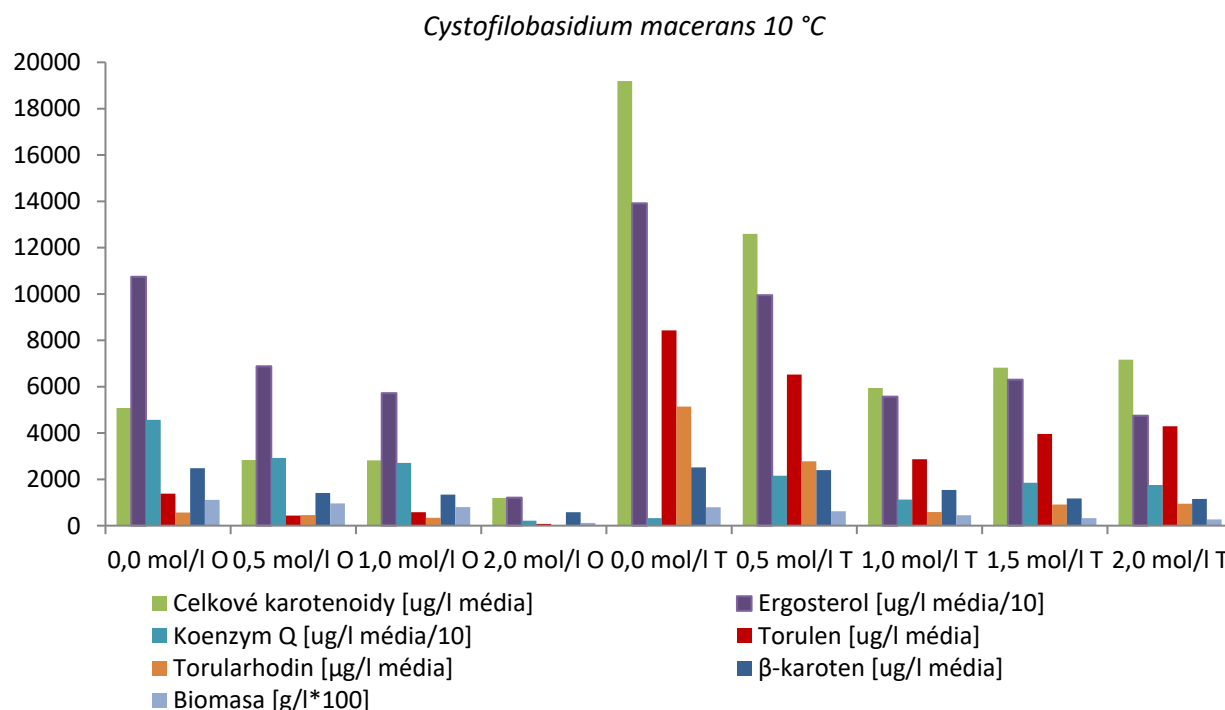
Při narůstající teplotě dochází k zvýšené akumulaci lipidů v biomase, kde získaný maximální obsah v biomase se pohyboval kolem 19 % a maximální výtěžek kolem 2,24 g/l. Při teplotách 10 °C a 15 °C je viditelná změna v zastoupení MK podle stupně saturace, kde dochází ke zvýšené syntéze PUFA. Naopak vyšší teploty indukují především MUFA.

5.1.3 Kmen *Cystofilobasidium macerans*

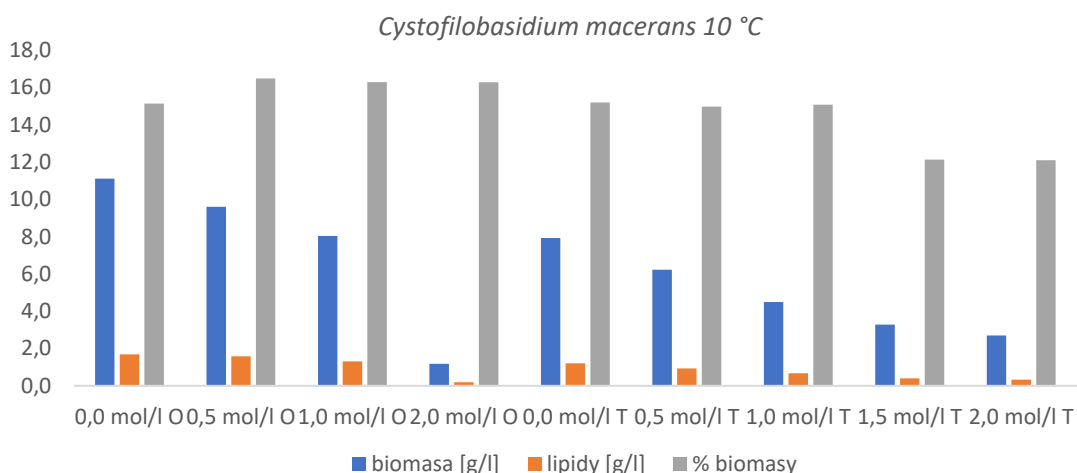
5.1.3.1 Aplikace teploty 10 °C

Kultivace při 10 °C kmenu *Cystofilobasidium macerans* je graficky znázorněná na (Obrázek 46). Je zde viditelný klesající trend produkce téměř všech metabolitů vystavených zvýšenému osmotickému tlaku. Na první pohled je znatelná zvýšená produkce všech metabolitů (kromě koenzymu Q a biomasy) vlivem absence světelného záření. Maximální výtěžky jsou pozorovány při kontrolním médiu za tmy, kde bylo získáno 19,2 mg/l celkových karotenoidů, 8,4 mg/l torulenu a 5,1 mg/l torularhodinu. Tento výsledek je velmi pozoruhodný a byla by možnost využití průmyslu, kde by se mohlo ušetřit na světelné energii. Při světelném záření docházelo k vyšším nárůstům biomasy (11,1 g/l) a koenzymu Q (45,7 mg/l).

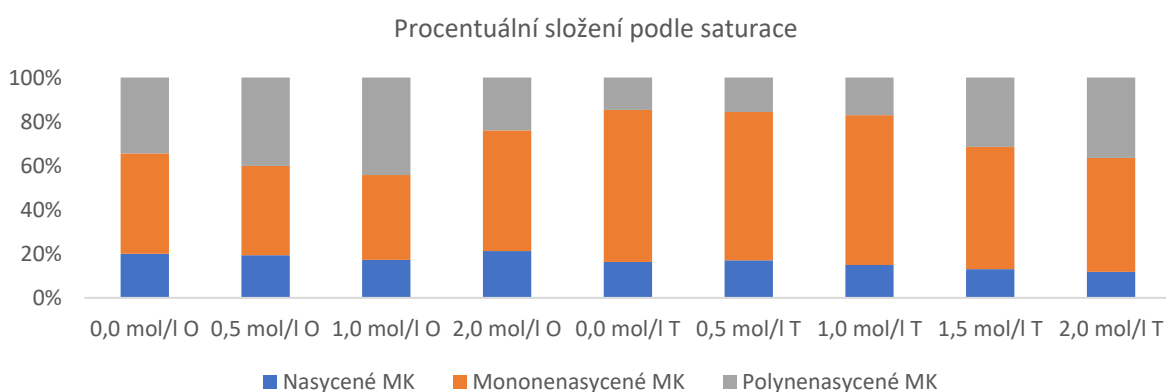
Na procentuální zastoupení lipidů v biomase nemá osmotický stres výrazný efekt. Mírně inhibiční efekt pozorujeme u 1,5 mol/l a 2,0 mol/l při tmě. Pokud jde o profil mastných kyselin, osmotický stres indukuje syntézu PUFA, která je výraznější při osvětlení.



Obrázek 46. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 10 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Cystofilobasidium macerans*



Obrázek 47. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 10 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Cystofilobasidium macerans*

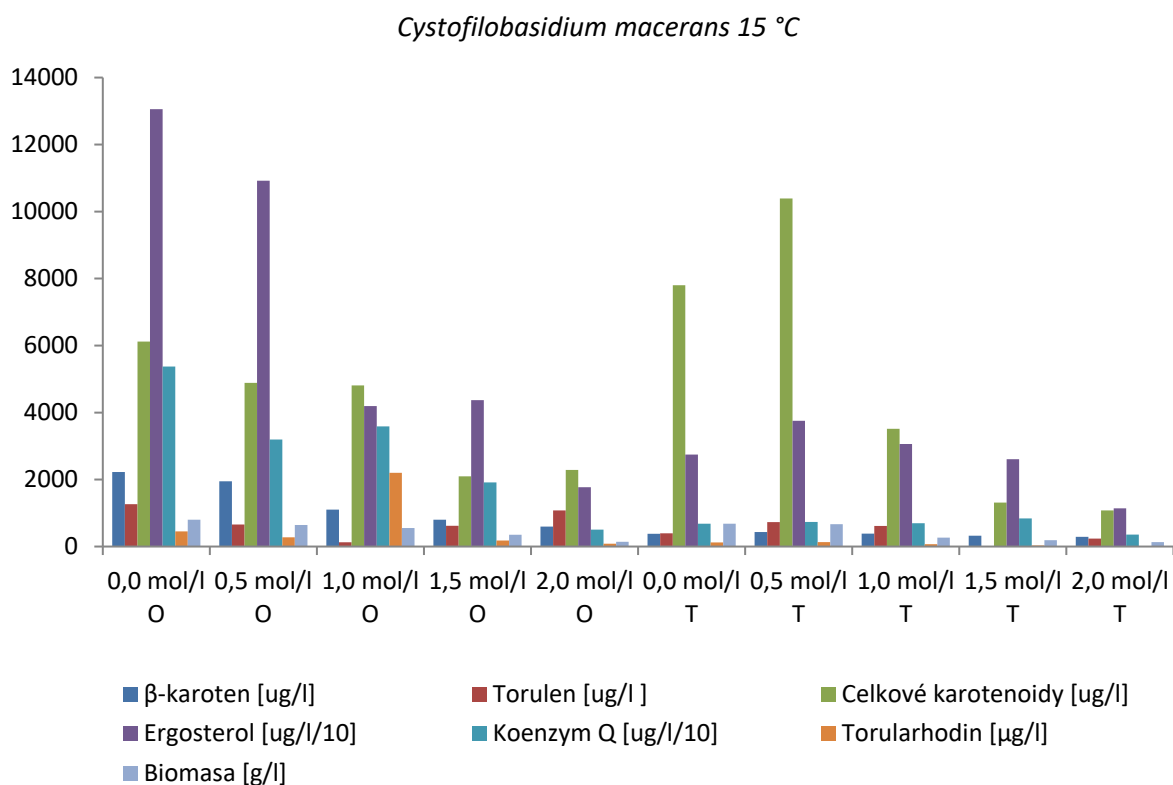


Obrázek 48. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace při teplotě 10 °C

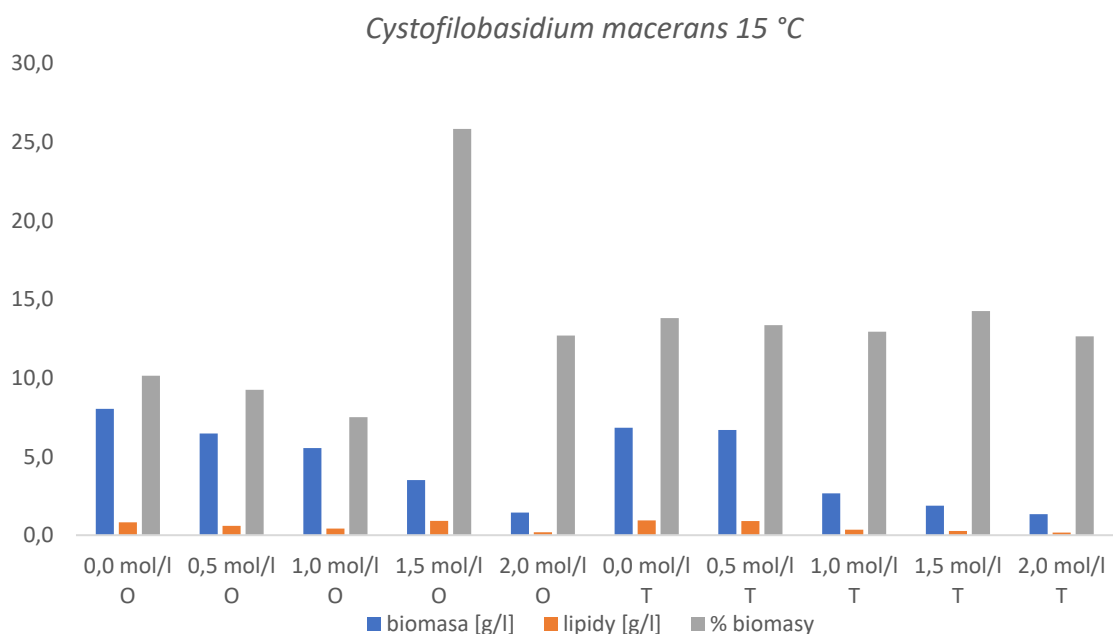
5.1.3.2 Aplikace teploty 15 °C

Na grafickém znázornění (Obrázek 49) je pozorovatelná snižující se závislost vlivem osmotického stresu (světlo i tma) s výjimkou velmi slabé indukce při 0,5 mol/l (tma). Pozorujeme zde obdobný trend jako u teploty 10 °C, kde při absenci světla dochází k prudkému zvýšení produkce celkových karotenoidů. Ačkoli dochází k vysoké produkci celkových karotenoidů, tak jednotlivé karotenoidy se z chromatogramu nedaly vyhodnotit, pravděpodobně zde došlo k degradaci torulenu, torularhodinu a β -karotenu. Pokud si povšimneme, při 0,5 mol/l (tma) dochází k indukci enzymatických systémů a zvýšené tvorbě metabolitů. Nejvyšší koncentrace karotenoidů jsou přítomny u 0,5 mol/l (tma) 10,4 mg/l. Při osvětlení pozorujeme zvýšenou syntézu ergosterolu (130 mg/l) a koenzymu Q (53,7 mg/l), která se snižuje obdobně s osmotickým stresem.

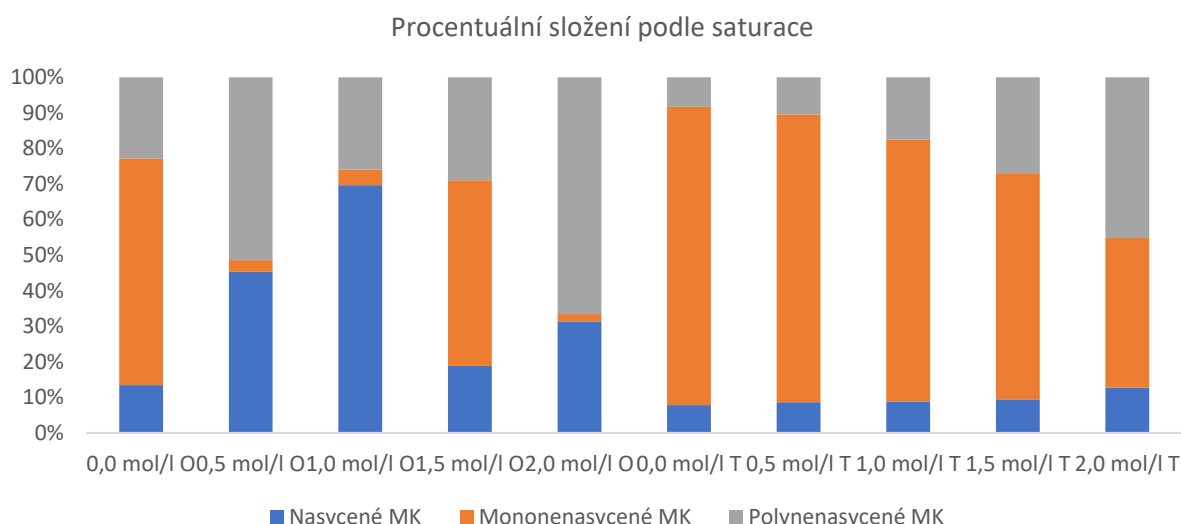
Procentuální množství a zastoupení lipidů má velmi neobvyklý charakter viz (Obrázek 50). Vlivem osmotického stresu při osvětlení se velmi mírně inhibuje obsah lipidů v biomase, ale při 1,5 mol/l má obsah lipidů až 15% nárůst procentuálního obsahu lipidů v biomase oproti kontrole. Vliv na změnu saturace při osvětlení je zde velmi vysoký a nemá výrazný trend. Je velmi zajímavé, že osmotický stres při tmě má výraznější vliv na syntézu karotenoidů, ale nedochází ke změně množství lipidů v buňce, ačkoli indukce PUFA je přítomná – až 40 % PUFA při 2 mol/l (Obrázek 51).



Obrázek 49. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 15 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Cystofilobasidium macerans*



Obrázek 50. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 15 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Cystofilobasidium macerans*

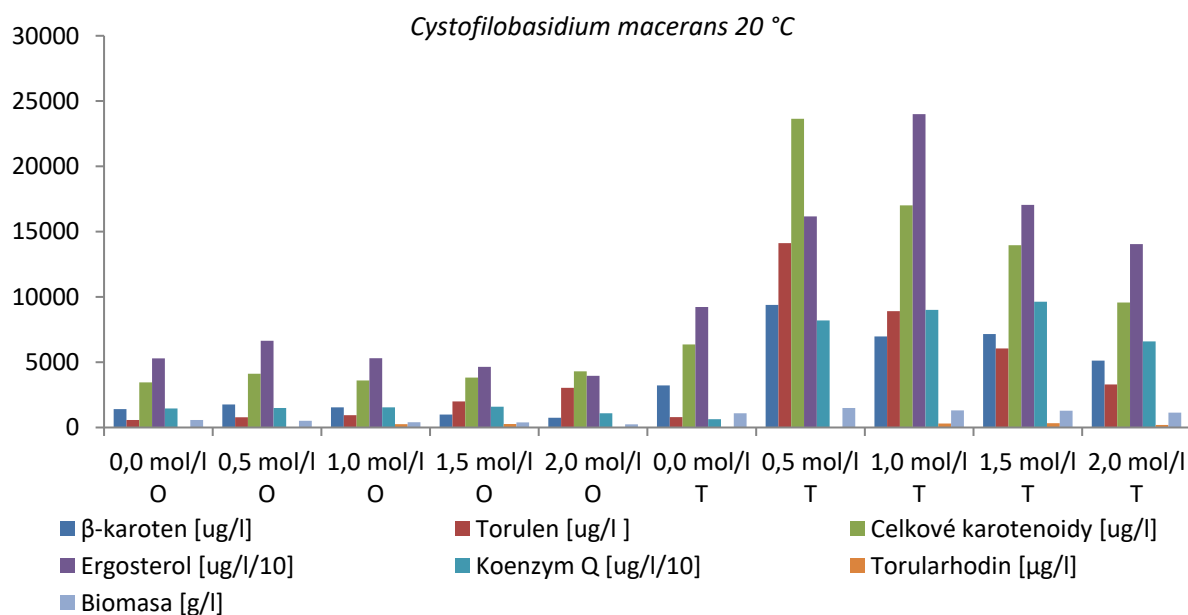


Obrázek 51. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace při teplotě 15 °C

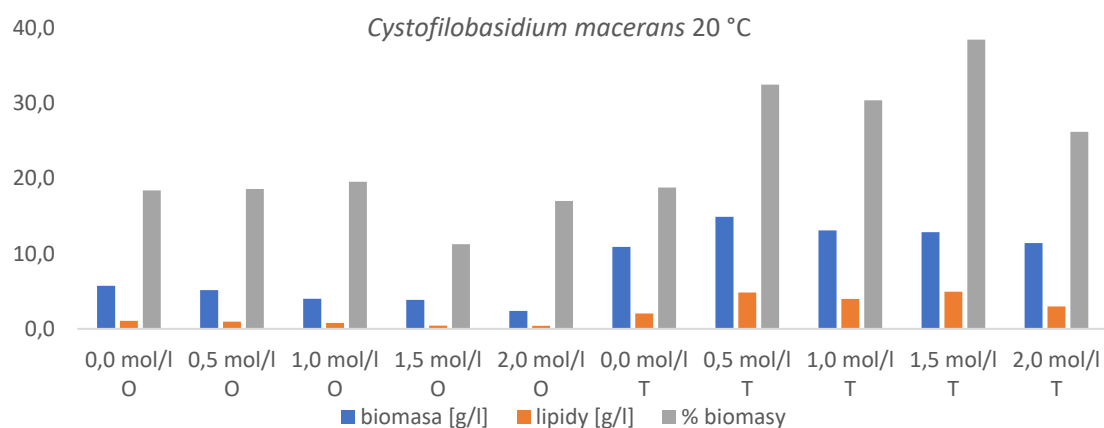
5.1.3.3 Aplikace teploty 20 °C

V případě kmene *Cystofilobasidium macerans* pozorujeme z grafu (Obrázek 52) při teplotě 20 °C výrazně zvýšený růst biomasy a ostatních metabolitů při tmě. Vzhledem k tomu, že kultivace nebyly paralelní ze stejného inokula, mohlo dojít k nestejným podmínkám. Velmi specifické výsledky by mohly být předmětem dalších studií. Kultura při osvětlení a stresu nereagovala na solný stres velmi výrazně. Ve tmě dochází u vyšších koncentrací NaCl k negativnímu vlivu na produkci téměř všech vybraných metabolitů. Při 0,5 mol/l lze vidět, že metabolismus je indukován v případě ergosterolu a inhibován v případě karotenoidů. Maximální výtěžky celkových karotenoidů při kontrolním médiu 23,6 mg/l, torulenu 14 mg/l, β -karotenu 14,1 mg/l. Nejvyšší nárůst biomasy byl sledován u produkčního média s 0,5 mol/l 14,9 g/l spolu s ergosterolem (240 mg/l). Pokud jde o koenzym Q, produkce je zvýšená ve tmě a je slabě indukována solným stresem. Oproti kontrolnímu médiu a 1,0 mol/l dochází k navýšení o 14,8 % (96,3 mg/l).

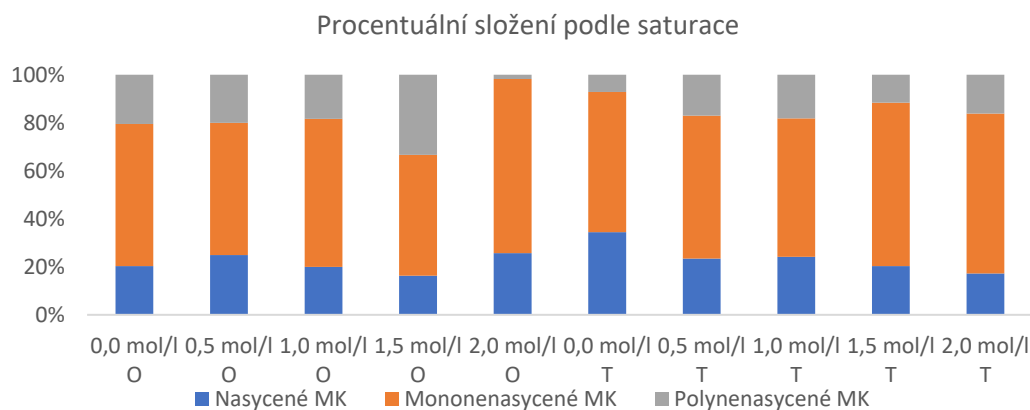
Lipidy měly v případě osvětlení a aplikaci solného stresu charakter se spíše snižovat (Obrázek 53). Ačkoli výtěžky lipidů se pohybovaly do 20 % biomasy, při zvýšeném osmotickém stresu bez světla docházelo k rapidně vyšší akumulaci lipidů. Při stresu 1,5 mol/l NaCl pozorujeme až 38,5 % lipidů v biomase (4,94 g/l). Jestliže budeme porovnávat nasycenost MK v závislosti na osvětlení a solném stresu (Obrázek 54), pozorujeme vlivem světla a tmy podobný trend, který se vlivem solného stresu posouvá spíše k MUFA a PUFA.



Obrázek 52. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 20 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Cystofilobasidium macerans*



Obrázek 53. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 20 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Cystofilobasidium macerans*

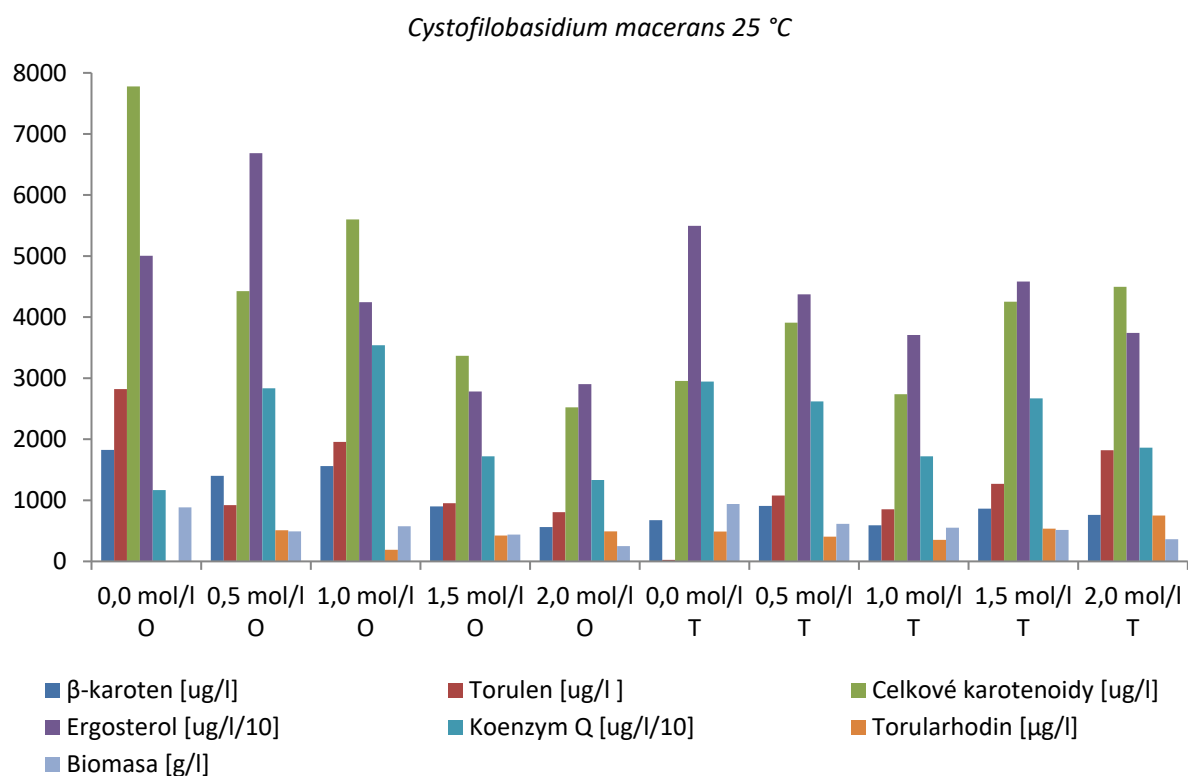


Obrázek 54. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace při teplotě 20 °C

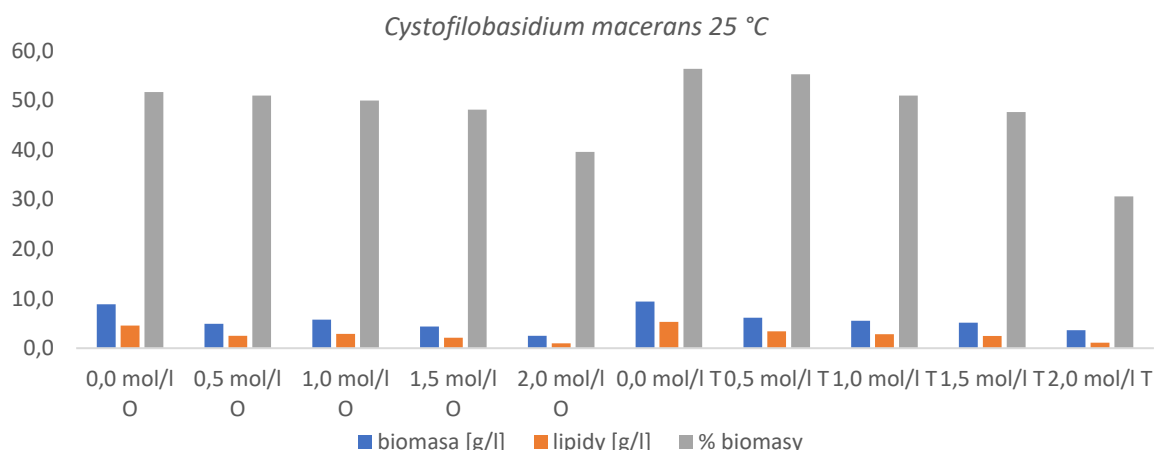
5.1.3.4 Aplikace teploty 25 °C

Z grafického znázornění (Obrázek 55) vidíme zvýšený nárůst kultury v prostředí bez světelného záření. Pokud ale porovnáme výtěžky stanovovaných metabolitů, je na první pohled znát rozdíl v produkci při světelném záření, které indukovalo jejich syntézu (7,7 mg/l celkových karotenoidů). Přídavek chloridu sodného inhiboval produkci téměř všech studovaných látek při osvětlení, vyjma ergosterolu (maximum 66 mg/l při 0,5 mol/l) a koenzymu Q s výtěžností 35 mg/l (1,0 mol/l). Lze předpokládat, že při určitých koncentracích dochází k indukci a změně aktivity biosyntetických drah. Při absenci světelného záření pozorujeme opačný efekt, kde osmotický stres indukuje tvorbu karotenoidů a zároveň inhibuje tvorbu koenzymu Q a ergosterolu.

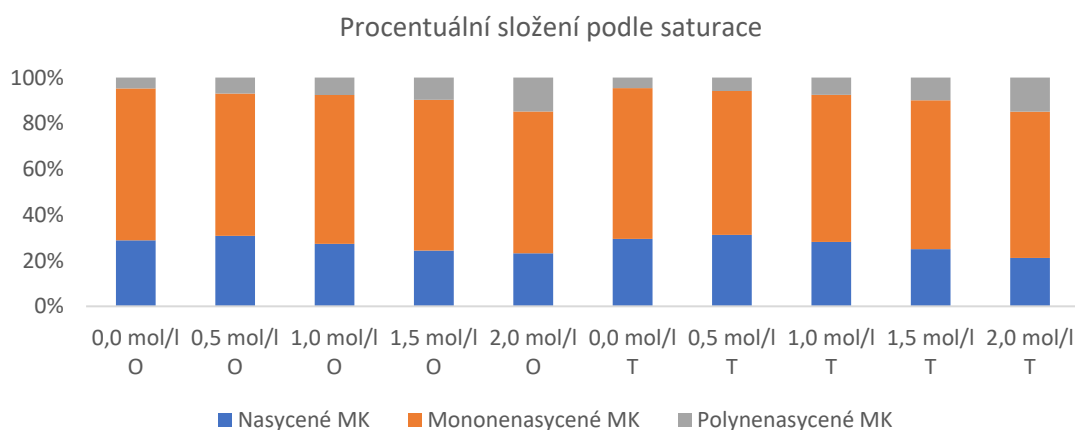
Z grafického znázornění (Obrázek 56) je patrné, že teplota 25 °C má výrazný efekt na tvorbu lipidů, která se ve tmě zvyšuje. Tento kmen v prostředí s 25 °C vykazuje při solném stresu snížené akumulace lipidů. V kontrolním médiu při tmě bylo dosaženo značně zajímavých výsledků – až 56,3 % lipidů v biomase s hodnotou 5,9 g/l média. Musíme dodat, že se potvrdila předpokládaná skutečnost, že souběžně dochází ke změně aktivity biosyntetických drah a rapidně snížené produkci karotenoidů a lipofilních metabolitů. Z grafu nasycenosti MK vidíme obdobný trend jako u ostatních teplot, solný stres indukuje tvorbu PUFA.



Obrázek 55. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 25 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Cystofilobasidium macerans*



Obrázek 56. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 25 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Cystofilobasidium macerans*



Obrázek 57. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace při teplotě 25 °C

5.1.3.5 Porovnání stresových faktorů u kmene *Cystofilobasidium macerans*

Jako nejoptimálnější podmínky pro růst kultury *Cystofilobasidium macerans* se jeví teplota 20 °C v tmavém prostředí (až 14,9 g/l při 0,5 mol/l). Při těchto podmínkách docházelo rovněž k nejvyšším produkcím karotenoidů, kde dosahovaly produkce až 23,6 mg/l. Výsledek tohoto experimentu je velice zajímavý, protože se předpokládalo, že světlo je hlavním induktorem tvorby karotenoidů. Mohlo by to být využitelné v průmyslu, kde by se šetřilo na světelné energii a tím by docházelo ke snížení ceny biotechnologické produkce.

Pro akumulaci lipidů se jeví jako optimum 25 °C, kde tma rovněž indukovala biosyntézu lipidů v buňce. Byly pozorovány výtěžky až 5,3 g/l média s obsahem lipidů v buňce až 56 %.

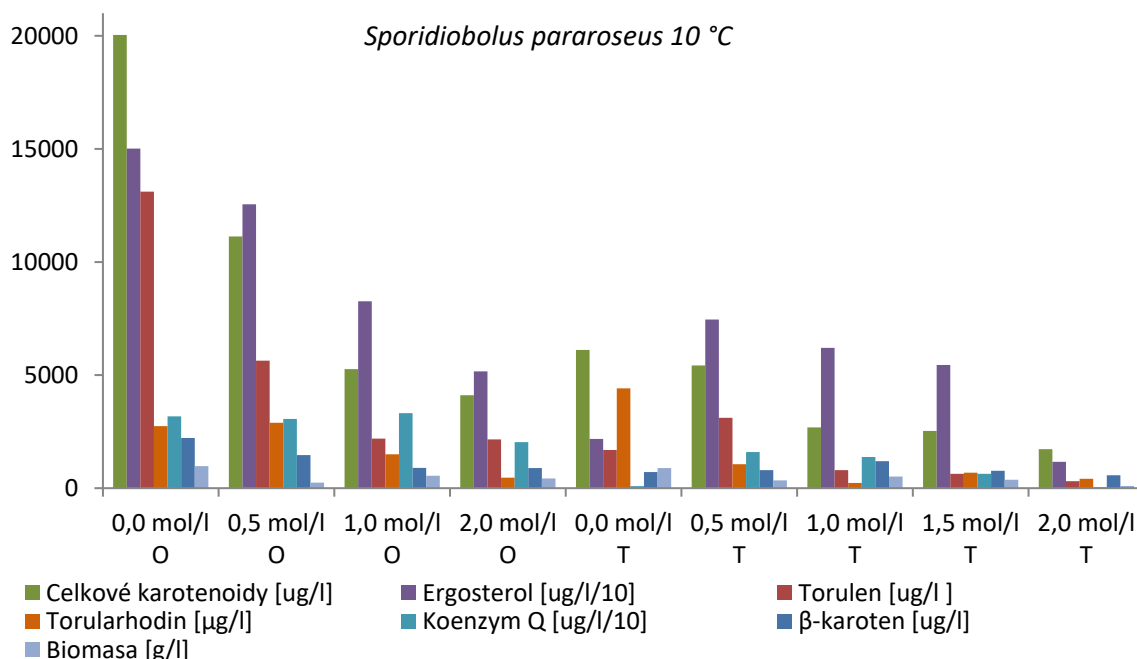
5.1.4 Kmen *Sporidiobolus pararoseus*

5.1.4.1 Aplikace teploty 10 °C

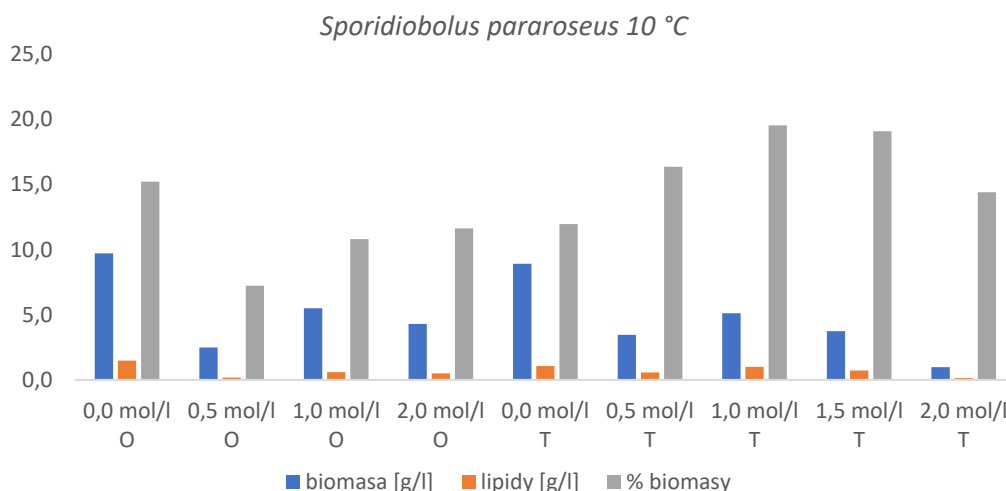
Kultivace při teplotě 10 °C kmene *Sporidiobolus pararoseus* měla inhibiční charakter na produkci vybraných látek vlivem solného stresu téměř u všech koncentrací. Jak vidíme z grafu (Obrázek 58), tak tma inhibuje biosyntetické dráhy. Ačkoliv u světla vliv solného stresu má jenom negativní efekt, u 0,5 mol/l chloridu sodného vidíme mírné navýšení produkce některých metabolitů.

Nejvyšší výtěžek všech metabolitů pozorujeme u kontrolního média při osvětlení (biomasa 9,7 g/l, celkové karotenoidy 20 mg/l, torulen 13,1 mg/l, torularhodin 2,7 mg/l, β -karoten 2,2 mg/l, ergosterol 150,1 mg/l a koenzym Q 31,8 mg/l).

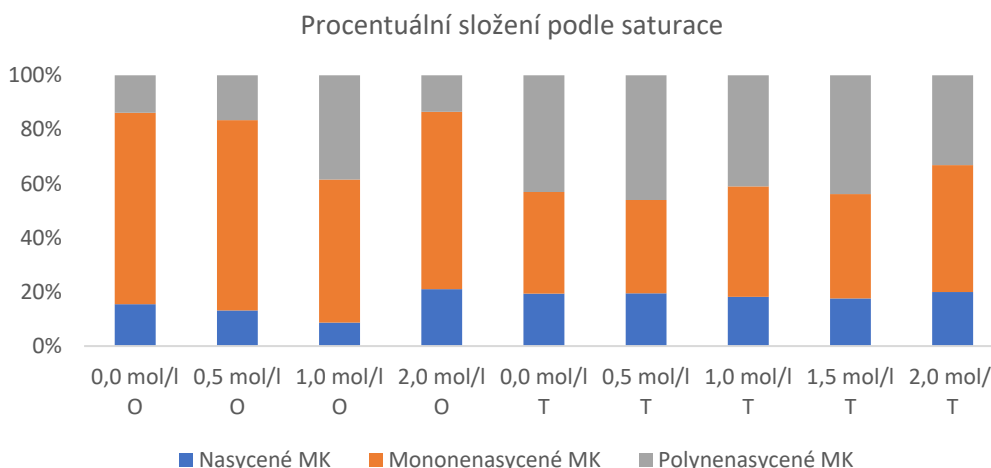
Z hlediska akumulace lipidů vidíme velmi neobvyklý trend, viz graf (Obrázek 59). V porovnání světla a tmy vidíme jednoznačně, že tma indukuje tvorbu lipidů. Při osvětlení dochází mírným osmotickým stresem k negativnímu efektu, ale po aplikaci vyšší koncentrace dochází ke stimulaci a buňky akumulují lipidy. Dle předpokladu opět se snižující se koncentrací karotenoidů dochází k vyšší produkci lipidů. V případě tmy pozorujeme zvýšení produkce v porovnání s kontrolním médiem až o 8 % lipidů v biomase. Značně pozoruhodná je změna profilu mastných kyselin ve tmě, která se posouvá spíše k PUFA až o 46 % (0,5 mol/l tma).



Obrázek 58. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 10 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Sporidiobolus pararoseus*



Obrázek 59. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 10 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Sporidiobolus pararoseus*

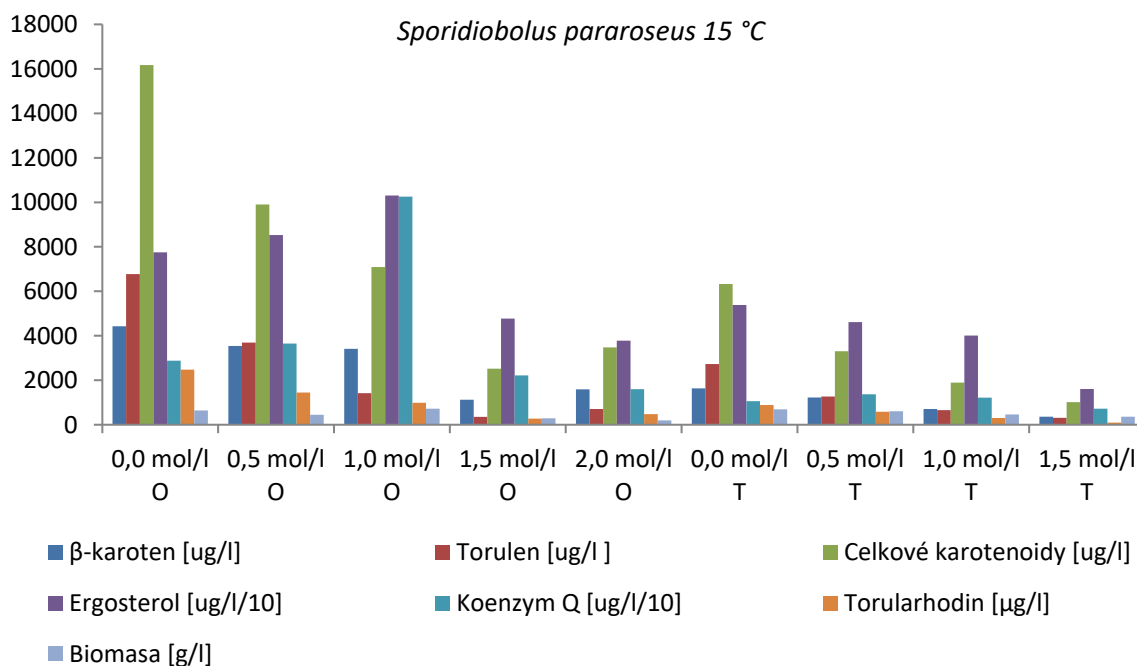


Obrázek 60. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace při teplotě 10 °C

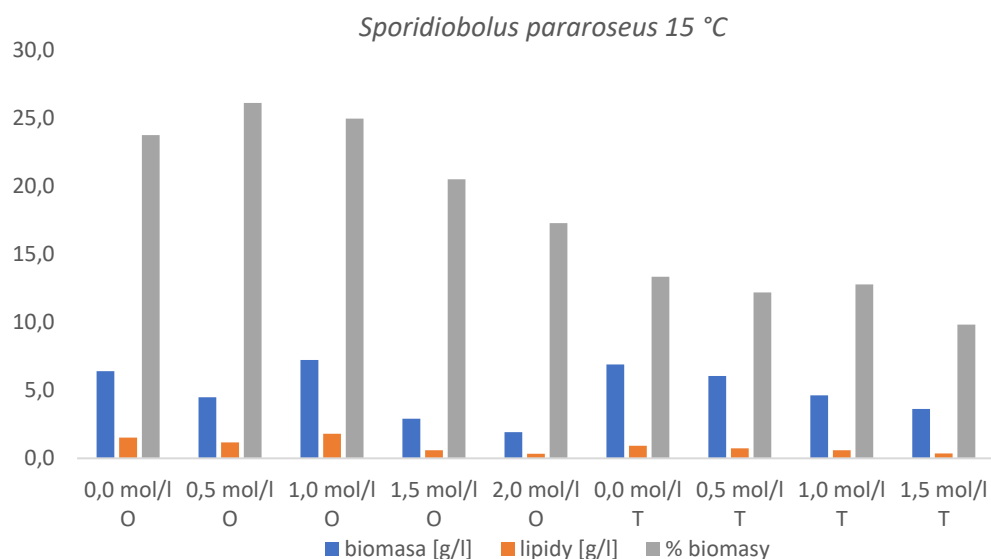
5.1.4.2 Aplikace teploty 15 °C

Při 15 °C sledujeme u kmene *Sporidiobolus pararoseus* podobný trend jako při 10 °C, kde dochází k inhibici solným stresem a ve tmě viz Obrázek 61. Při zvýšeném osmotickém stresu 1,0 mol/l se zdá, že tato koncentrace indukuje tvorbu koenzymu Q (102,5 mg/l), ergosterolu (103,7 mg/l) a celkově růst buněk, ale naopak inhibuje produkci karotenoidů. Nejvyšší výtěžky karotenoidů jsou pozorovány při kontrole (světlo), kde dosahují 16,1 mg/l celkových karotenoidů, 6,8 mg/l torulenu, 2,5 mg torularhodinu a 4,4 mg/l β -karotenu.

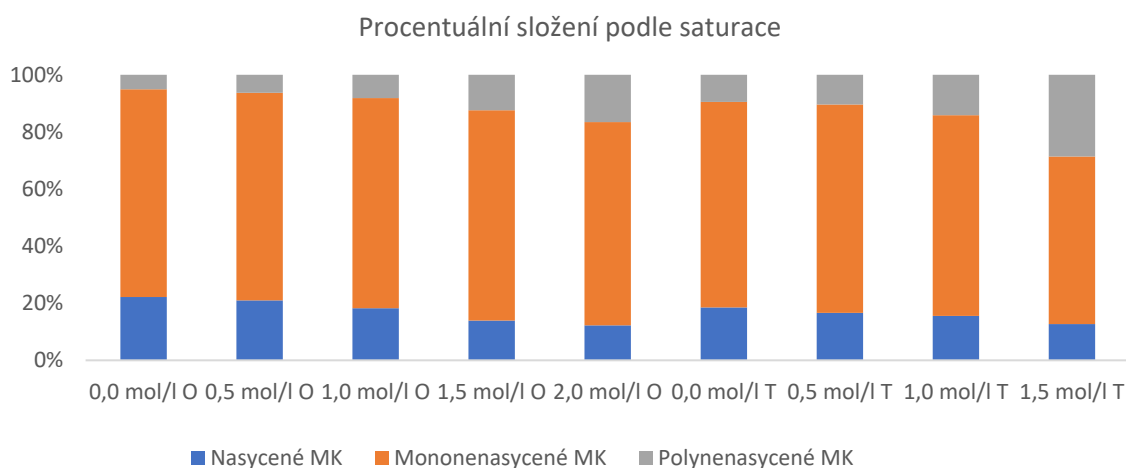
Z grafického znázornění (Obrázek 62) je viditelné, že produkce lipidů se snižuje vlivem tmy. Rovněž dochází k mírnému zvýšení lipidů při 1,0 mol/l, jako je tomu u koenzymu Q a ergosterolu. Z dalšího grafického zobrazení pozorujeme změnu profilu mastných kyselin, která se za obou světelných podmínek vlivem chloridu sodného posouvá k PUFA a snižuje se MUFA a SFA.



Obrázek 61. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 15 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Sporidiobolus pararoseus*



Obrázek 62. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 15 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Sporidiobolus pararoseus*

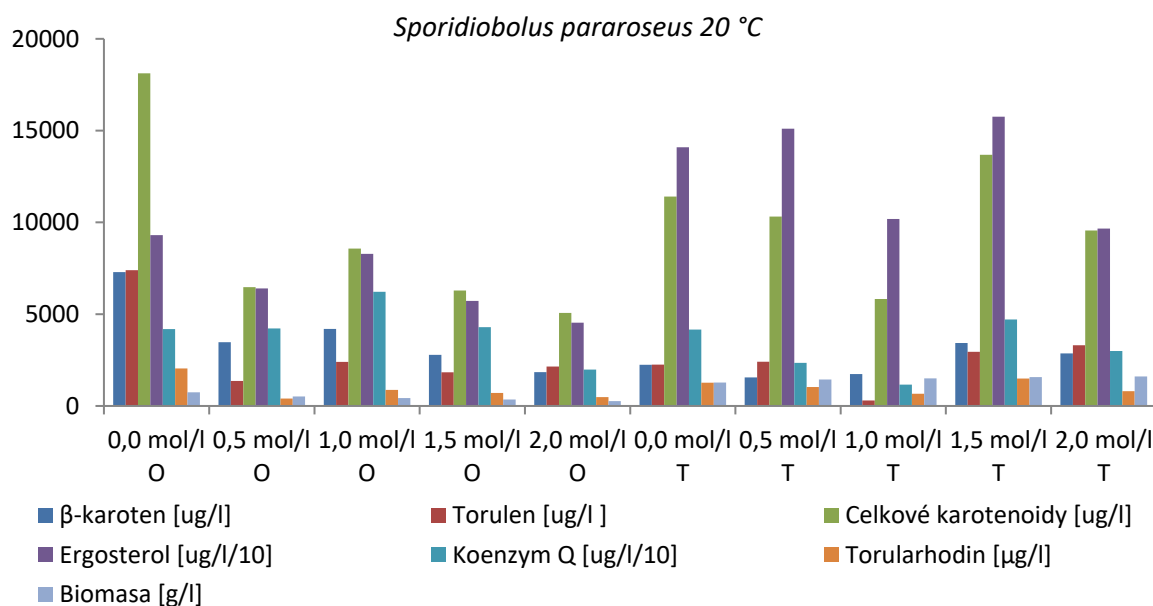


Obrázek 63. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace při teplotě 10 °C

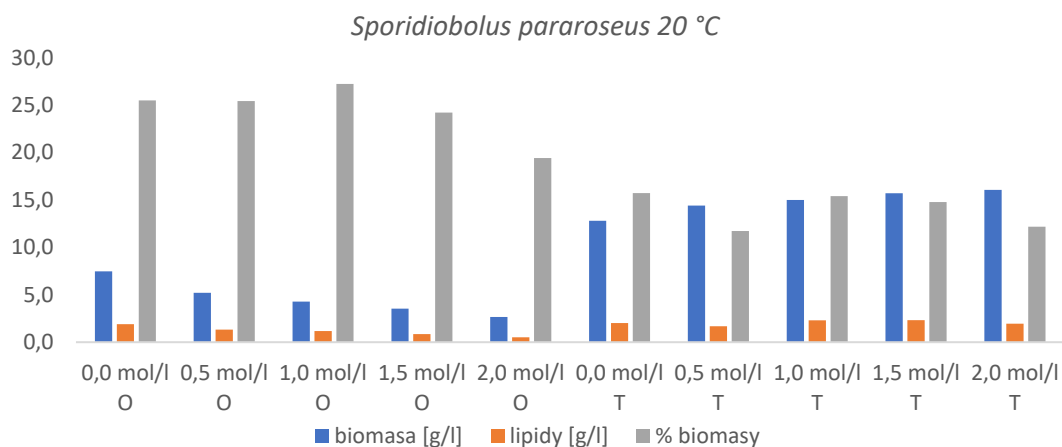
5.1.4.3 Aplikace teploty 20 °C

V případě kultivace při teplotě 20 °C, z grafického znázornění (Obrázek 64) vyplývá, že tma vykazovala lepší podmínky pro růst kultury, který se převážně zvyšoval vlivem solného stresu. Karotenoidy byly indukovány v tomto případě světelným zářením, kde nejvyšší dosažené hodnoty se pohybovaly u kontrolního média s výtěžky 18,1 mg/l celkových karotenoidů, 7,3 mg/l β -karotenu, 7,4 mg/l torulenu a 2,41 mg/l torularhodinu. Nejvyšší hodnota ergosterolu byla při 1,5 mol/l NaCl ve tmě s 157,6 mg/l a koenzym Q byl naopak nejvyšší při světle a 1,0 mol/l NaCl.

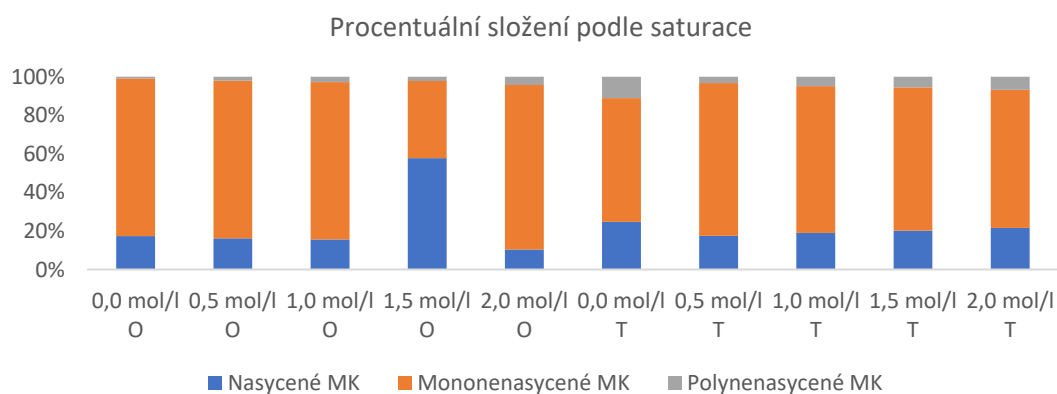
Na grafu viz (Obrázek 65) je poznat, že tento kmen vykazoval vyšší aktivitu pro akumulaci lipidů v buňce při světle (maximum 27,2 %). Pokud se výtěžek vztáhne na 1 litr média, tak nejvyšší výtěžnost byla pozorována při tmě 1,0 mol/l a 1,5 mol/l NaCl, vzhledem k vyšším nárůstům biomasy (2,3 g/l lipidů).



Obrázek 64. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 20 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Sporidiobolus pararoseus*



Obrázek 65. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 20 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Sporidiobolus pararoseus*

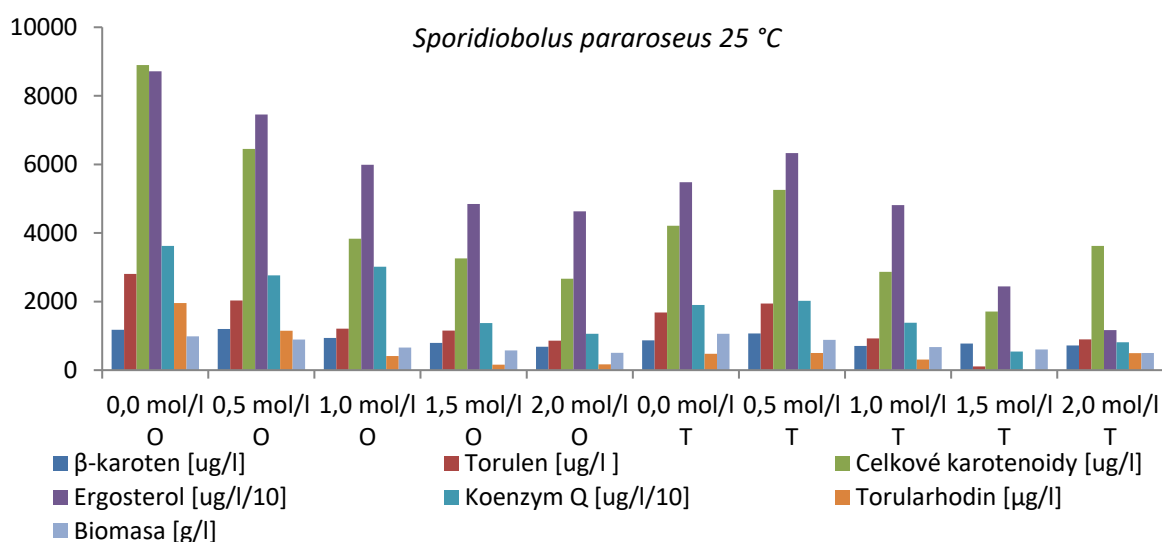


Obrázek 66. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace při teplotě 20 °C

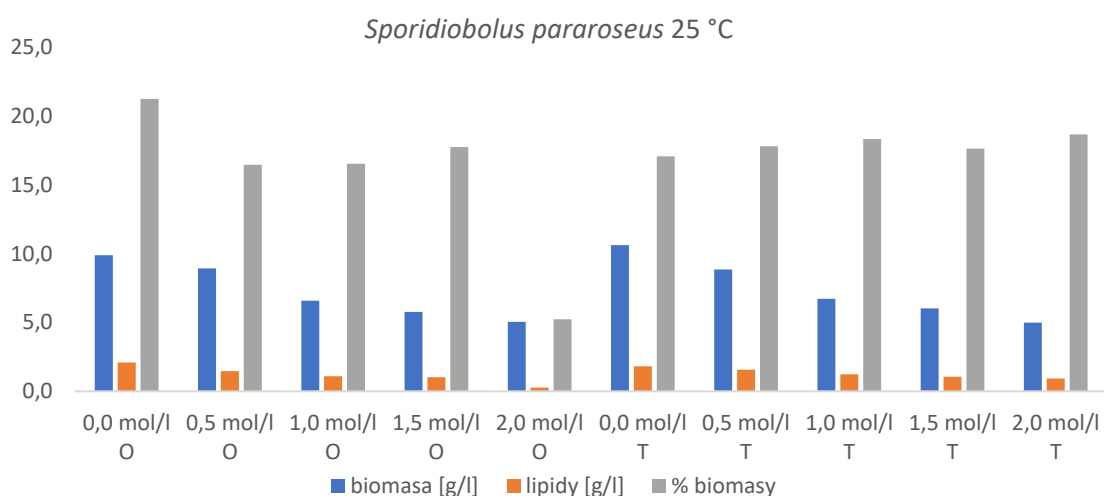
5.1.4.4 Aplikace teploty 25 °C

Při zvyšující teplotě z grafického znázornění (Obrázek 67) vyplývá, že vlivem teploty, solného stresu a tmy dochází ke snížení produkce karotenoidů a ostatních metabolitů. Ačkoliv docházelo ke snížení všech metabolitů, kultura vykazovala v kontrolním médiu lepší růst (10,6 g/l) a pouze při 0,5 mol/l a 2,0 mol/l NaCl v produkčním médiu pozorujeme mírnou indukci tvorby jednotlivých metabolitů. Maximální produkce jsou při zvolených podmínkách v kontrolním médiu, kde dosahuje 8,9 mg/l celkových karotenoidů, 8,7 mg/l ergosterolu, 2,8 mg/l torulenu, 1,9 mg/l torularhodinu a 36,2 mg/l koenzymu Q. Při solném stresu je viditelná velmi slabá indukce pro tvorbu β -karotenu 1,2 mg/l.

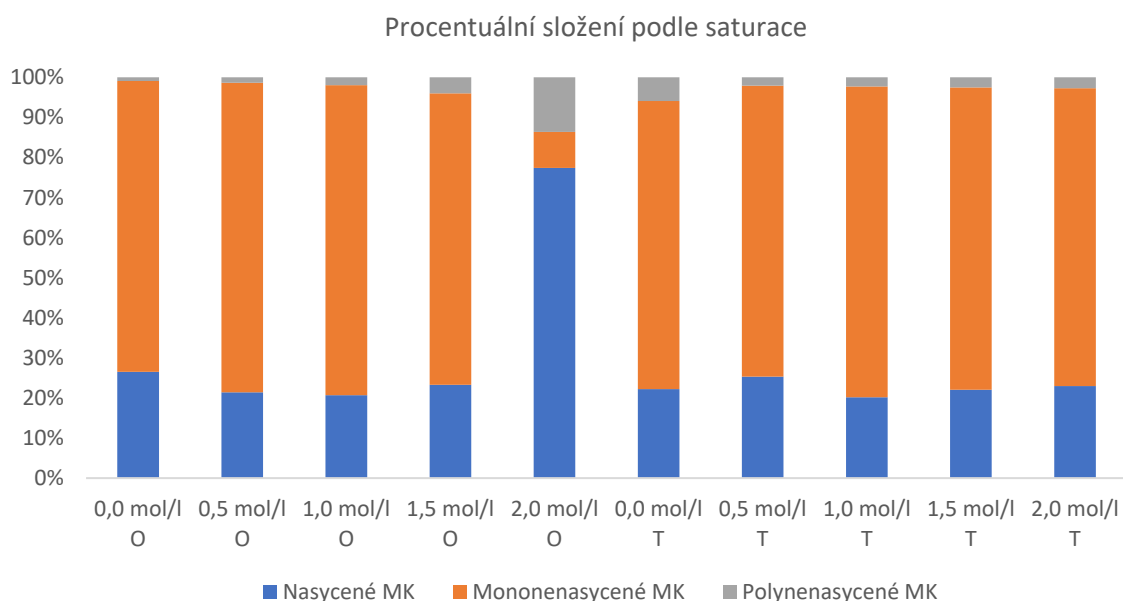
Lipidy nevykazují přílišné rozdíly vlivem tmy/světla a solného stresu (Obrázek 68). Pouze u 2 mol/l NaCl je vidět inhibice. Maximální tvorba lipidů v biomase je 21,2 % s výtěžností 2 g/l média. Jestliže srovnáme zastoupení jednotlivých mastných kyselin, je vidět slabý nárůst MUFA vyjma vzorku při vysokém osmotickém stresu (světlo), kde se rapidně posouvá profil MK spíše k SFA (Obrázek 69).



Obrázek 67. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 20 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Sporidiobolus pararoseus*



Obrázek 68. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 20 °C v závislosti na různé koncentraci NaCl, osvětlení a absenci osvětlení u kmene *Sporidiobolus pararoseus*



Obrázek 69. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace teplotě při 20 °C

5.1.4.5 Porovnání stresových faktorů u kmene *Sporidiobolus pararoseus*

Jako neoptimálnější podmínky pro růst kultury *Sporidiobolus pararoseus* se jeví teplota 20 °C v tmavém prostředí (až 16,0 g/l při 2,0 mol/l). Jako induktor pro produkci celkových karotenoidů je teplota 10 °C u kontroly (světlo), kde dosahovaly produkce až 20 mg/l. Při 25 °C vidíme velmi slabé produkce pro tvorbu všech metabolitů. Nejvyšší produkce ergosterolu jsou při 20 °C ve tmě (158 mg/l). U koenzymu Q je nejvyšší produkce při solném stresu při 15 °C – až 102 mg/l. Vyšší akumulace lipidů se pohybovala téměř u všech kultivací v rozmezí 20 až 25 % v biomase. Nejvyšší koncentrace lipidů byla při 25 °C u kontroly (světlo) s výtěžností 2,1 g/l.

5.2 Řasy a sinice

V tomto experimentu byly kultivovány kmeny mikrořas *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella saccharophila*, *Chlorella sorokiniana*, *Botryococcus brauni* a sinice *Arthrospira maxima* a *Synechococcus nidulans*. V první části byly provedeny obdobné solné stresy jako u kvasinek, a to 0,5 mol/l, 1,0 mol/l, 1,5 mol/l a 2,0 mol/l přidavkem NaCl do média. Vzhledem k tomu, že se jedná o sladkovodní mikroorganismy, bylo při prvních experimentech zjištěno, že koncentrace nad 1,0 mol/l měla letální účinek u všech sledovaných kmenů. Předpokládáme, že pokud by se aplikoval solný stres v exponenciální fázi, tak by nemuselo docházet k likvidačním účinkům, ale stres by mohl buňky indukovat k produkci zajímavých metabolitů. Tyto podmínky by mohly být předmětem dalších prací. Experiment byl kultivován po dobu 7 dnů viz kapitola 4.5.2.1.

V další etapě byl aplikován světelný stres, kde bylo po dobu 3 dnů nastaveno jednotné osvětlení $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a poté bylo aplikováno na jednotlivé zkumavky $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, $600 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a $800 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. U tohoto experimentu byla doba kultivace prodloužena na 14 dnů (viz kapitola 4.5.2.2). Vliv světelného záření pro růst řas je klíčový, protože intenzita složení záření je velmi důležitým parametrem. Vhodná intenzita je důležitá pro řízení biotechnologické produkce žádaných metabolitů. Pokud se aplikuje velmi nízká intenzita, může to zapříčinit především velmi pomalý průběh fotosyntézy, a tím snížený růst řas. Naopak zvýšená intenzita může poškodit fotosystémy a tím dochází až k odumírání buněk.

5.2.1 Kmen *Scenedesmus dimorphus*

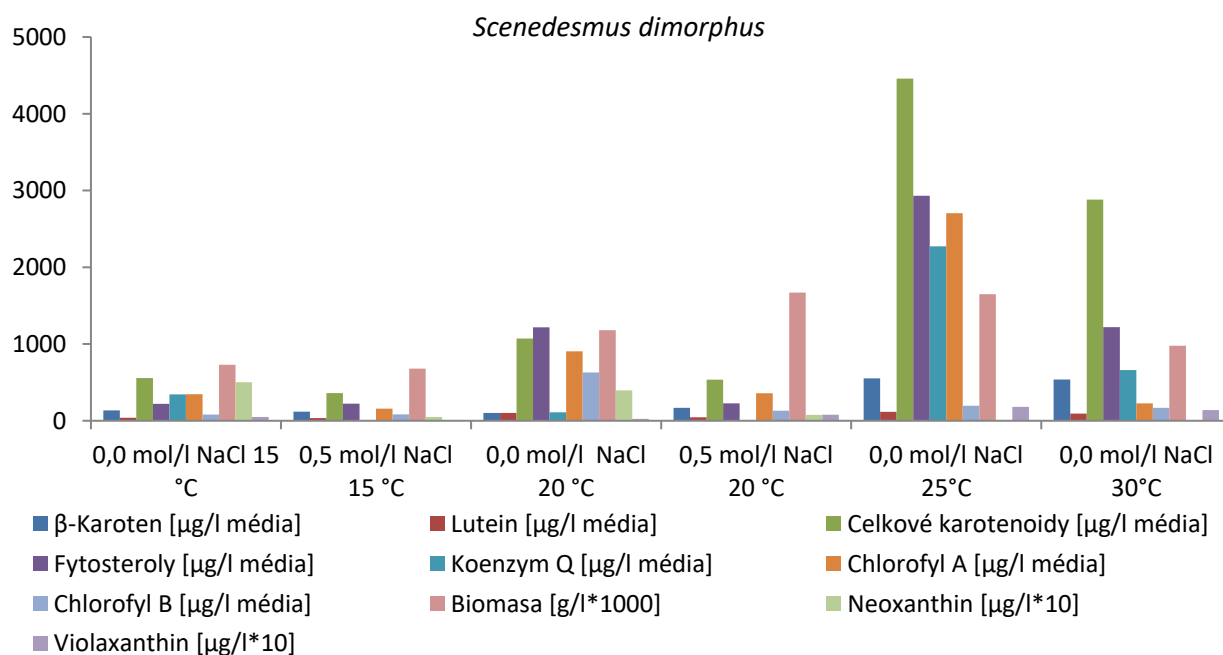
5.2.1.1 Aplikace teploty a solného stresu

U kultivace kmene *Scenedesmus dimorphus* bylo zjištěno, že stres nad 1,0 mol/l NaCl měl letální účinek při všech teplotách. Dále při 20 °C a 25 °C docházelo k letálnímu efektu i při 0,5 mol/l NaCl. Z grafického znázornění (Obrázek 70) je na první pohled viditelné, že optimum je při 25 °C. Ostatní teploty vykazovaly rapidní snížení všech metabolitů. Nejvyšší stanovené výtěžky byly pozorovány u kontrolního média, kde celkové karotenoidy měly 4,5 mg/l, chlorofyl A 2,7 mg/l, chlorofyl B 0,2 mg/l, fytosteroly 2,9 mg/l a lutein 116 µg/l, 553 µg/l β-karoten, 18,1 µg/l violaxanthin s nárůstem biomasy 1,65 g/l.

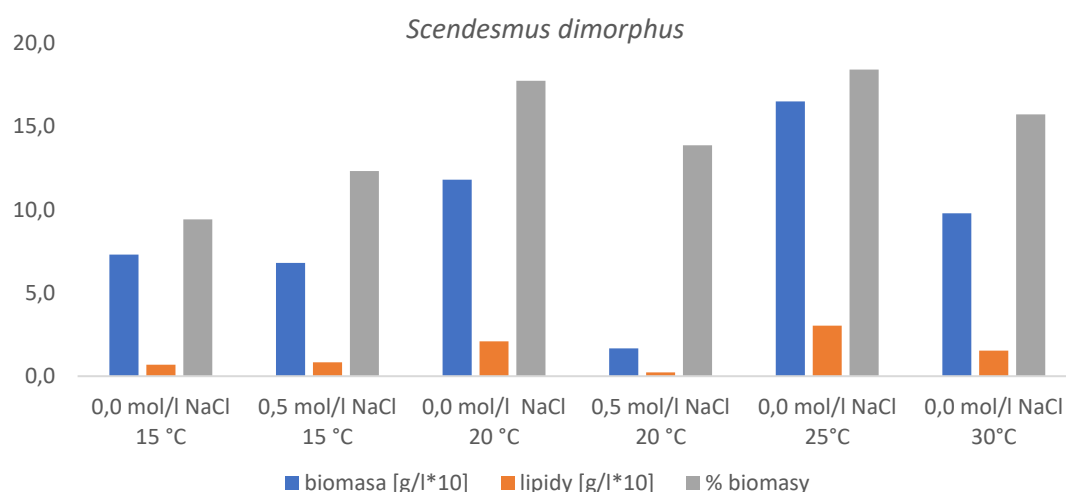
Zajímavé je, že při teplotě 20 °C docházelo při solném stresu ke zvýšenému nárůstu biomasy. Ačkoli jsou výtěžky neoxanthinu velmi malé, tak jsou pozorovány pouze u nižších teplot, kde maximum dosahovalo 50,2 µg/l (kontrola 15 °C) a 39,6 µg/l (kontrola 20 °C). Literatura tvrdí, že optimum řasy rodu *Scenedesmus* se pohybuje při 28 °C až 30 °C, které se v tomto experimentu potvrdilo [38].

Z grafického znázornění (Obrázek 71) je vidět, že optimální teplota pro produkci lipidů je rovněž 25 °C (18,4 % biomasy s výtěžností 0,3 g/l lipidů, při 20 °C je obsah velmi obdobný, ale vzhledem k nižší biomase je výtěžnost malá).

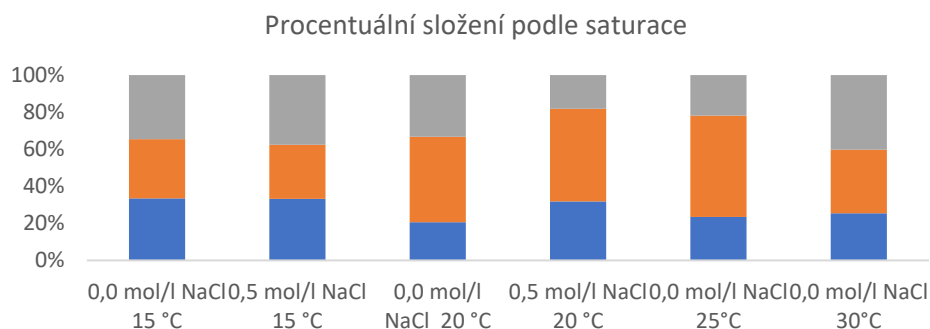
Při zhodnocení změny profilu nasycenosti MK viz (Obrázek 72) vidíme, že při nižších a vyšších teplotách, než je optimum, obsahují buňky přibližně 33 % SFA, 32 % MUFA a 35 % PUFA. Při teplotě 20 °C a 25 °C dochází ke zvýšení MUFA na 46 až 55 %.



Obrázek 70. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 15 °C, 20 °C, 25 °C a 30 °C v závislosti na aplikaci solného stresu u kmene *Scenedesmus dimorphus*



Obrázek 71. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 15 °C, 20 °C, 25 °C a 30 °C v závislosti na aplikaci solného stresu u kmene *Scenedesmus dimorphus*

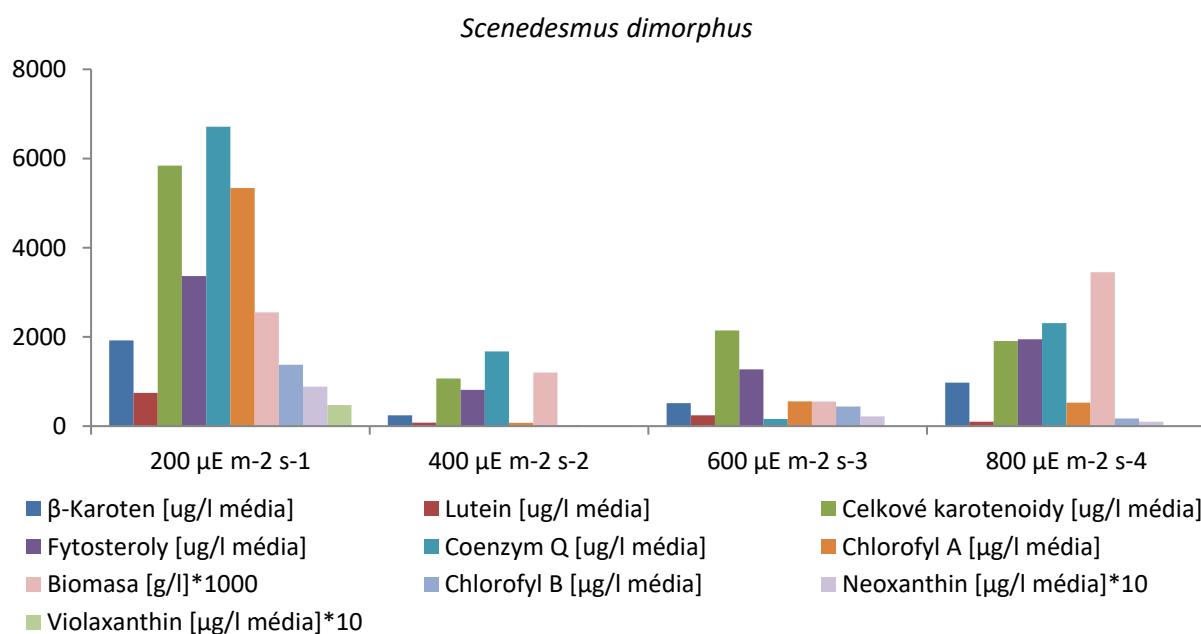


Obrázek 72. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *Scenedesmus dimorphus*

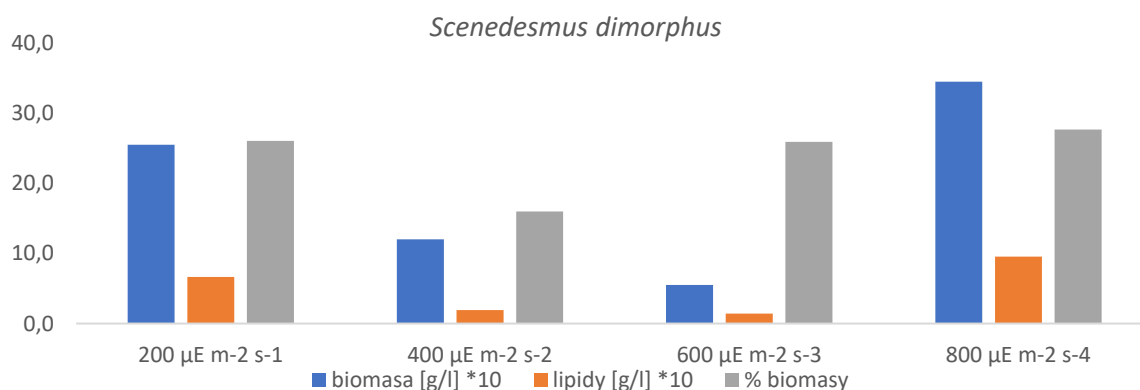
5.2.1.2 Aplikace světelného stresu

Z grafu na (Obrázek 73) je na první pohled patrné, že intenzita osvětlení $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a $600 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ měla negativní efekt nejenom na růst buněk, ale i na produkci látek. V případě aplikace velmi vysokého osvětlení až $800 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ docházelo k zvýšenému nárůstu kultury (3,45 g/l), ale naopak se snižovaly všechny stanovené metabolity. Můžeme předpokládat, že došlo k inhibici fotosyntézy vlivem vyššího světelného záření. Nejvyšší výtěžky jsou tedy při osvětlení $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ s výtěžkem 2,6 g/l biomasy, 5,8 mg/l celkových karotenoidů, 5,3 mg/l chlorofylu A, 1,4 mg/l chlorofylu B, 6,7 mg/l koenzymu Q, 3,4 mg/l fytosterolů, 1,9 mg/l β -karotenu, 88 $\mu\text{g/l}$ neoxanthinu a 47 $\mu\text{g/l}$ violaxanthinu.

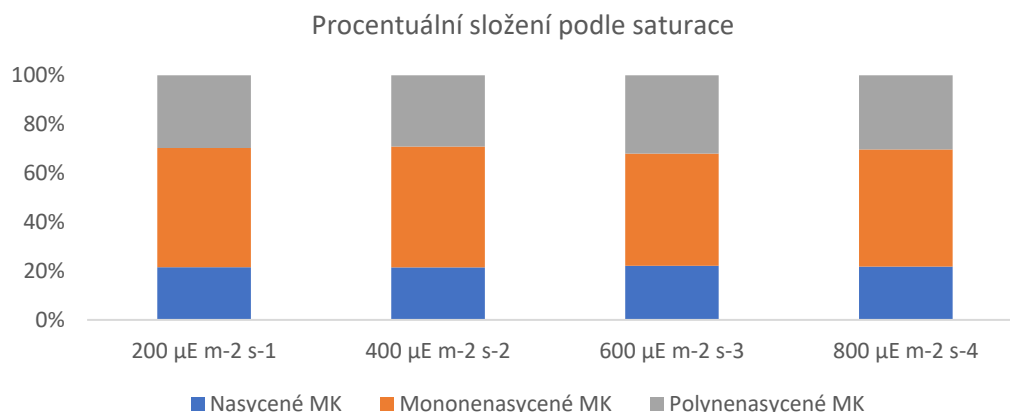
Při analýze lipidů kmene *Scenedesmus dimorphus* byl zjištěn stejný trend jako u produkce karotenoidů a dalších výše uvedených lipofilních metabolitů. Při optimálním osvětlení pro růst kultury docházelo ke zvýšení akumulace lipidů (26 až 28 % biomasy), kde nejvyšší výtěžnost lipidů byla při $800 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ vzhledem k vyššímu nárůstu biomasy (1 g/l). Pokud porovnáme profil nasycenosti MK v závislosti na osvětlení, je velmi zajímavé, že nedocházelo k přílišným rozdílům viz Obrázek 75.



Obrázek 73. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 25°C v závislosti na aplikaci světelného stresu u kmene *Scenedesmus dimorphus*



Obrázek 74. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 25°C v závislosti na aplikaci světelného stresu u kmene *Scenedesmus dimorphus*



Obrázek 75. Grafické znázornění procentuálního zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *Scenedesmus dimorphus* v závislosti na světelném stresu

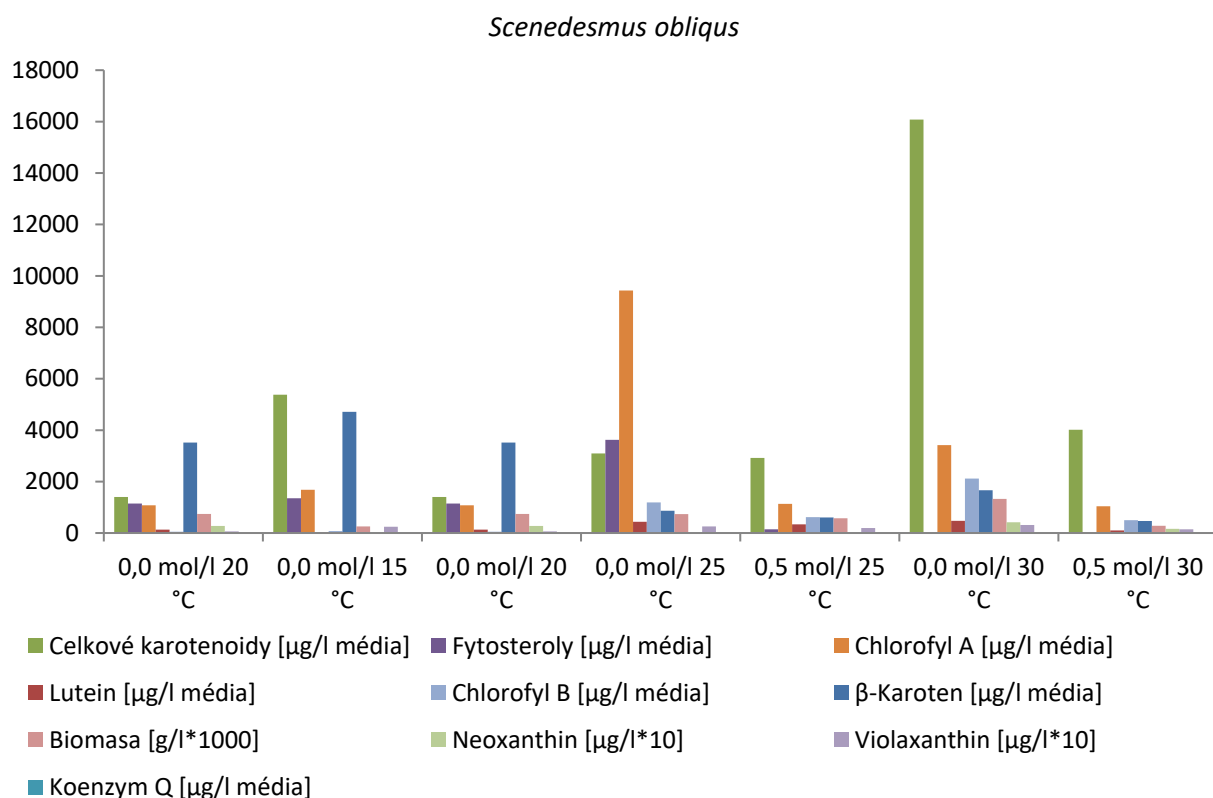
5.2.2 Kmen *Scenedesmus obliquus*

5.2.2.1 Aplikace teploty a solného stresu

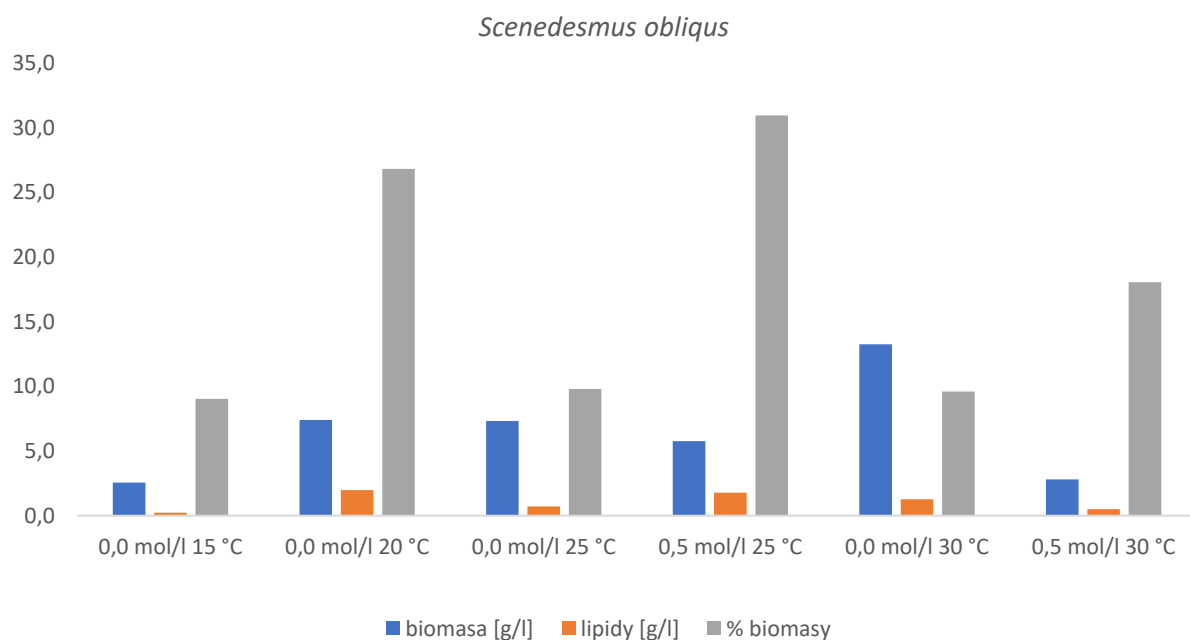
Z grafického znázornění (Obrázek 76) je viditelné, že mimo teplotního optima (25 °C a 30 °C) docházelo k letálním účinkům již při 0,5 mol/l NaCl. Můžeme si povšimnout, že vlivem stresu při nižších teplotách (15 °C a 20 °C) byla navýšená produkce β -karotenu (až 4,7 mg/l). Srovnáme-li produkci v optimu, solný stres vykazoval negativní efekt na syntézu všech metabolitů. Při 30 °C docházelo k nejlepšímu nárůstu kultury (1,3 g/l), dále k vysoké produkci celkových karotenoidů 16,0 mg/l a 2,1 mg/l chlorofylu B. Je velmi zvláštní, že produkce fytosterolů byla viditelná pouze do teploty 25 °C (3,6 mg/l). Můžeme předpokládat, že řasové buňky produkují několik druhů fytosterolů (různě esterifikované a jiné), které pravděpodobně použitou metodou analýzy nešlo identifikovat a kvantifikovat (viz kapitola 4.6). Nejvyšší produkce chlorofylu A byla pozorována při teplotě 20 °C s výtěžkem 9,4 mg/l. Literatura uvádí, že neoptimálnější teplota rodu *Scenedesmus* se pohybuje od 28 °C do 30 °C, takže i v tomto případě se potvrdilo optimum pro produkci [38].

Z grafického znázornění lipidů (Obrázek 77) je zjevné, že optimální teplota pro produkci lipidů je 20 °C a 25 °C (0,5 mol/l). Můžeme předpokládat, že při snížené schopnosti tvorby karotenoidů, vlivem nižší teploty nebo solného stresu, buňky akumulovaly spíše lipidy (30,9 % biomasy při 25 °C).

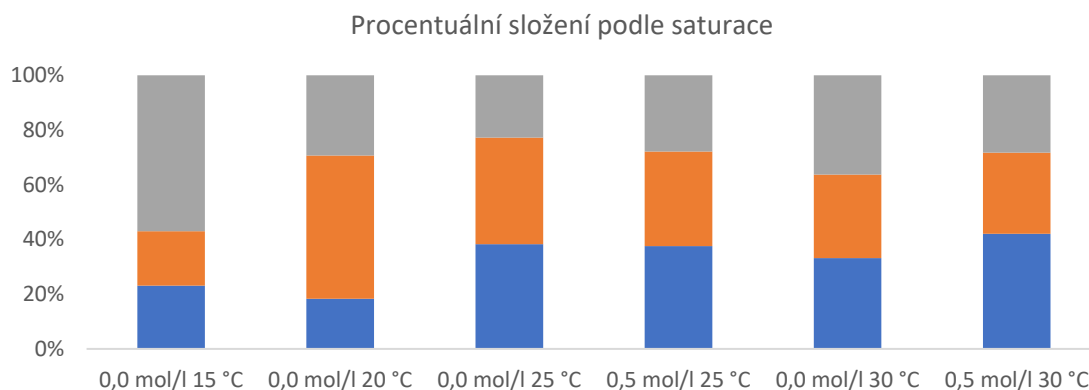
Průběh závislosti na procentuální zastoupení MK v buňkách je zobrazen v Obrázek 78. Vlivem solného stresu nedocházelo k výraznému ovlivnění změny MK. Naopak při nižších teplotách dochází k zvýšené produkci PUFA, kde při 15 °C je až 57 %.



Obrázek 76. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 15 °C, 20 °C, 25 °C a 30 °C v závislosti na aplikaci solného stresu u kmene *Scenedesmus obliquus*



Obrázek 77. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 15 °C, 20 °C, 25 °C a 30 °C v závislosti na aplikaci solného stresu u kmene *Scenedesmus obliquus*

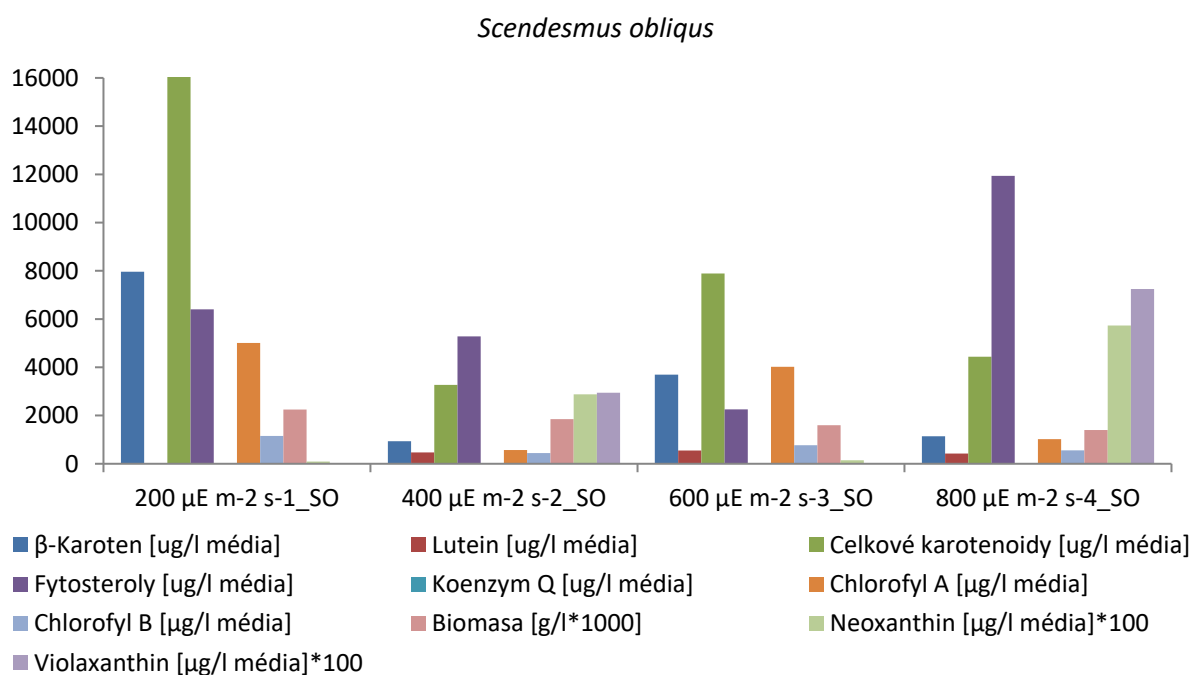


Obrázek 78. Grafické znázornění procentuálního zastoupení zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *Scenedesmus obliquus*

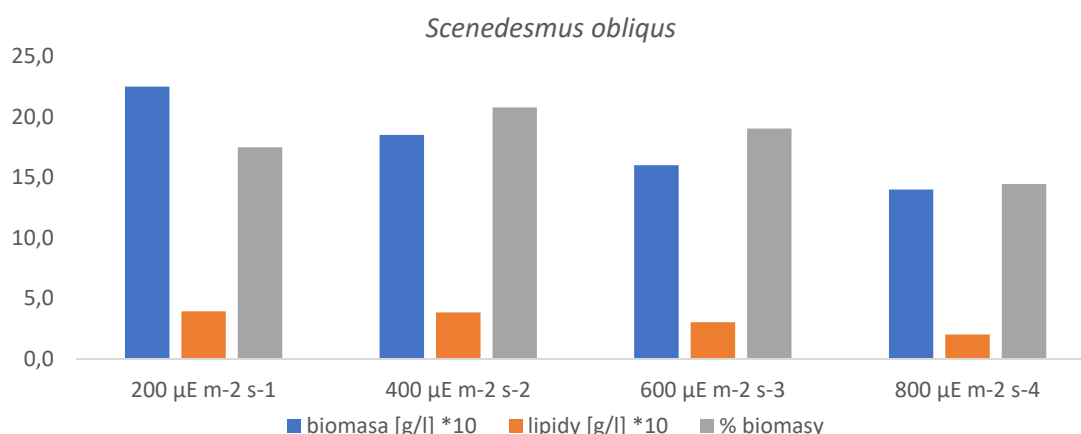
5.2.2.2 Aplikace světelného stresu

U kmene *Scenedesmus obliquus* pozorujeme snižující se růst v závislosti na zvyšujícím se světelném záření. Můžeme předpokládat, že vyšší intenzity světelného záření inhibují proces fotosyntézy. Dále zde pozorujeme obdobný trend jako u výše zmíněného kmene *Scenedesmus dimorphus*, kde jako optimální světelné záření se jeví $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pro produkci téměř všech metabolitů. Při aplikaci $600 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a $800 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ následně vidíme mírně zvýšené produkce některých metabolitů, což může být odpovědí na světelný stres (11,9 mg/l fytosterolů, 57 $\mu\text{g/l}$ neoxanthinu a 72,4 $\mu\text{g/l}$ violaxanthinu). Nejvyšší pozorované výtěžky celkových karotenoidů jsou 16 mg/l, 8 mg/l β -karotenu, 5,0 mg/l chlorofylu A a 1,1 mg/l chlorofylu B.

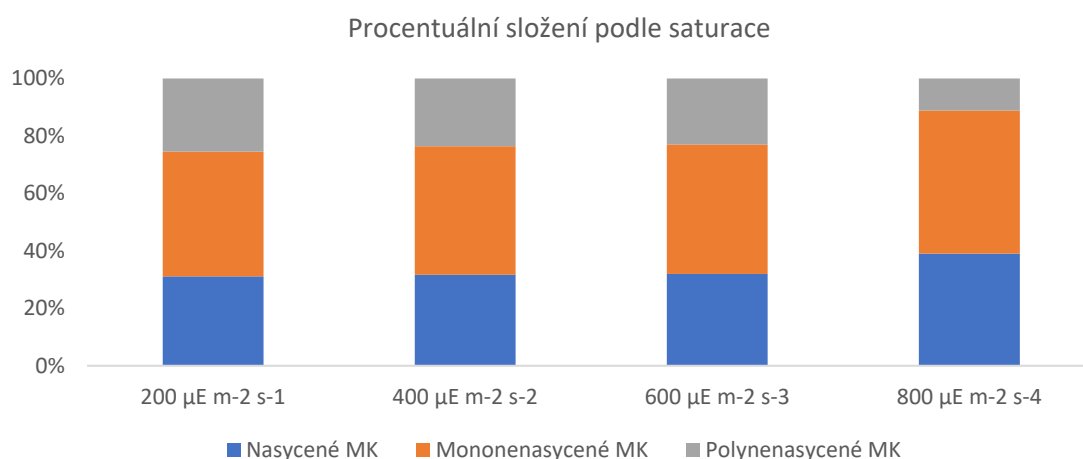
V případě stanovení akumulace lipidů u kmene *Scenedesmus obliquus* vidíme snižující se tendenci vlivem světelného záření. Nejvyšší dosažená výtěžnost lipidů u $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ je 0,4 g/l. Na rozdíl od kmene *Scenedesmus dimorphus* zde pozorujeme změnu v saturaci MK viz Obrázek 81. Při zvyšujícím se osvětlení pozorujeme trend zvýšení SFA a MUFA.



Obrázek 79. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 25 °C v závislosti na aplikaci světelného stresu u kmene *Scenedesmus obliquus*



Obrázek 80. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 25 °C v závislosti na aplikaci světelného stresu u kmene *Scenedesmus obliquus*



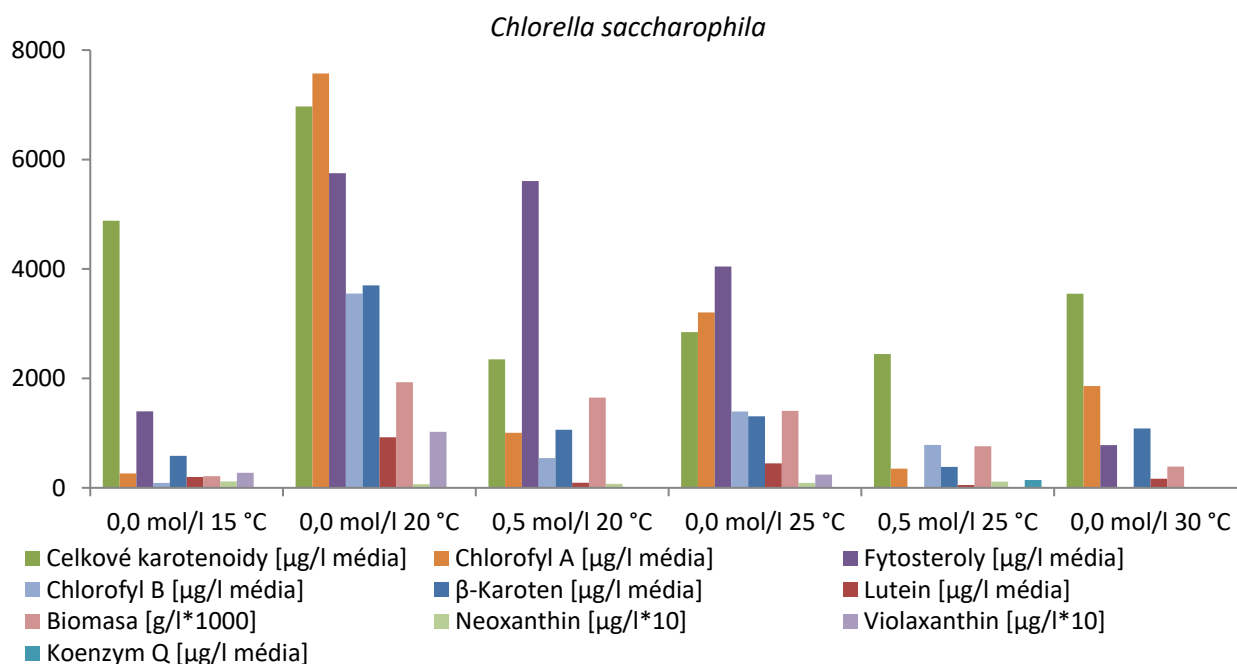
Obrázek 81. Grafické znázornění procentuálního zastoupení zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *Scenedesmus obliquus* v závislosti na světelném stresu

5.2.3 Kmen *Chlorella saccharophila*

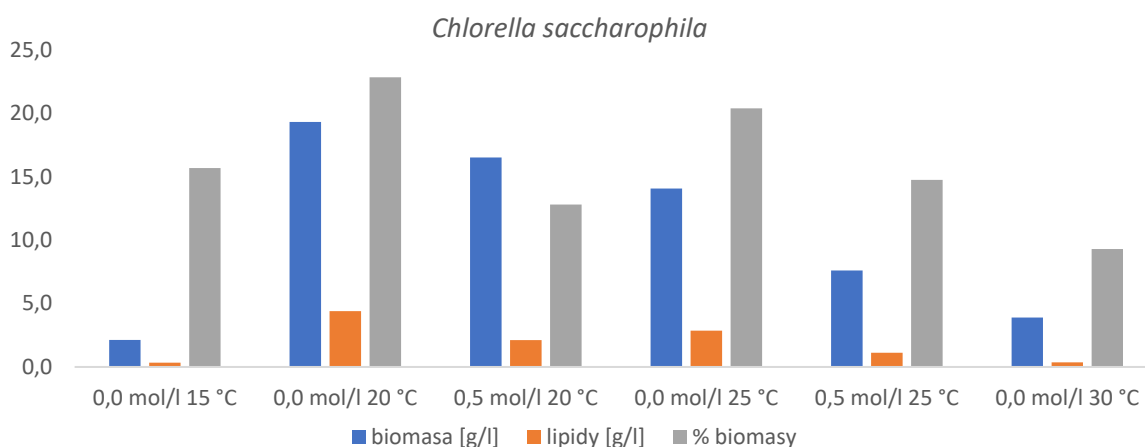
5.2.3.1 Aplikace teploty a solného stresu

Z grafu je na první pohled patrné, že teplotní optimum pro růst kultury a jednotlivých metabolitů je 20 °C. Jak již bylo zmíněno výše, tak solný stres měl také negativní efekt na růst kultury a produkci metabolitů. Koncentrace vyšší než 1,0 mol/l měly pro buňky letální účinek. Pouze při 20 °C a 25 °C buňky dokázaly tento vyšší osmotický stres tolerovat pouze do 0,5 mol/l NaCl, ale došlo k inhibici produkce metabolitů. Literatura uvádí, že rod *Chlorella* je schopen růst v širokém rozmezí teplot, což se potvrdilo i experimentem, i když docházelo k inhibici růstu a produkce [75, 76].

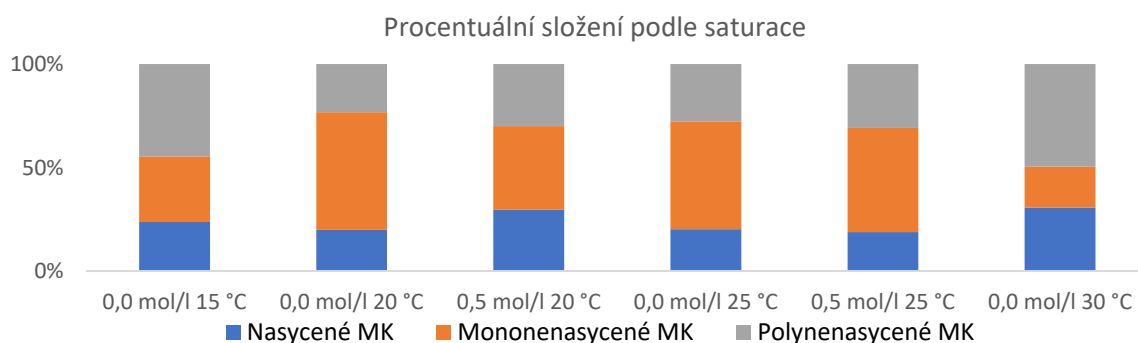
Jednoznačně nejvyšší výtěžky byly pozorovány u kontrolního média, kde dosahovaly 7,0 mg/l celkových karotenoidů, 0,9 mg/l luteinu, 3,6 mg/l chlorofylu B, 7,6 mg/l chlorofylu A, 3,7 mg/l β-karotenu, 102,4 µg/l violaxanthinu, s nárůstem biomasy 1,9 g/l. Obdobný trend jako u karotenoidů je pozorován při syntéze lipidů viz (Obrázek 83). Maximum produkce lipidů je při 20 °C (kontrola) s 23 % lipidů v biomase a výtěžkem 0,44 g/l média. V případě změny nasycenosti MK vlivem stresu je patrné, že více stresované buňky s nižším nárůstem biomasy a karotenoidů vykazovaly vyšší produkci PUFA (až 50 %).



Obrázek 82. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 15 °C, 20 °C, 25 °C a 30 °C v závislosti na aplikaci solného stresu u kmene *Chlorella saccharophila*



Obrázek 83. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 15 °C, 20 °C, 25 °C a 30 °C v závislosti na aplikaci solného stresu u kmene *Chlorella saccharophila*



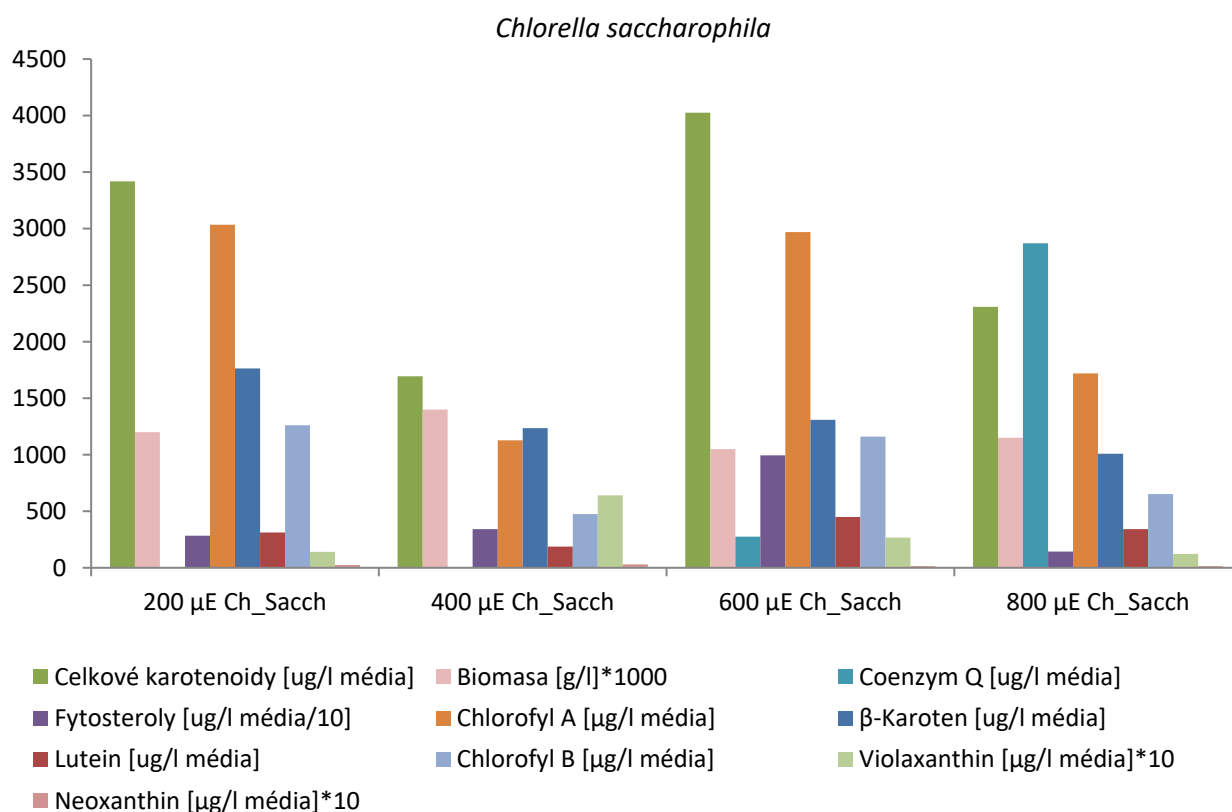
Obrázek 84. Grafické znázornění procentuálního zastoupení zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *Chlorella saccharophila*

5.2.3.2 Aplikace světelného stresu

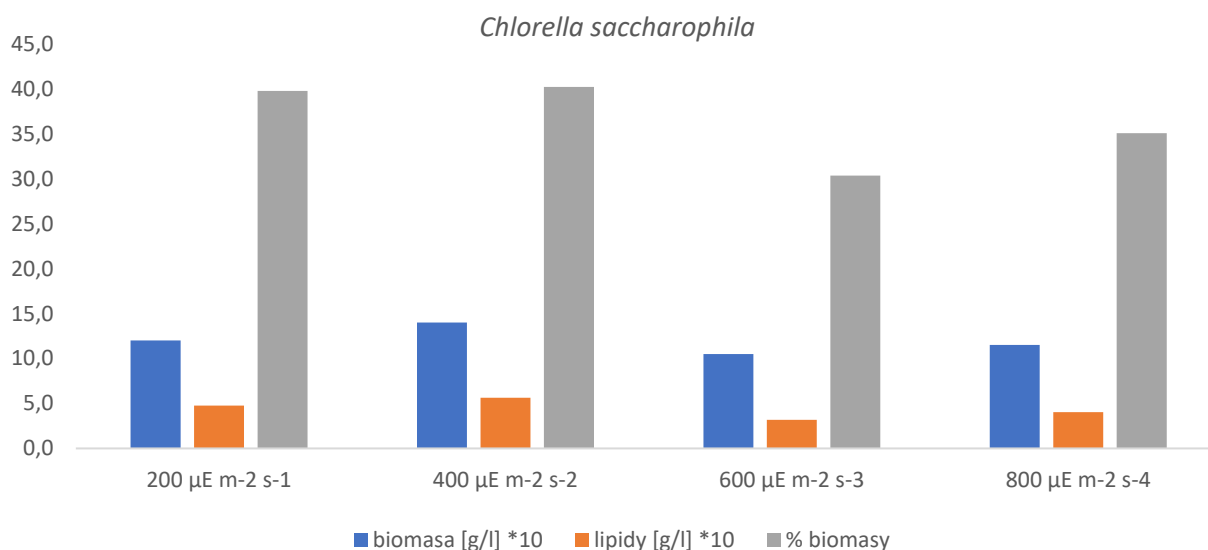
Dalším kmenem, kde byl sledován světelný stres je *Chlorella saccharophila*. Tento rod je známý tím, že dokáže provádět fotosyntézu a účinně přeměňovat na chemickou energii relativně při nízkých hodnotách světelné intenzity již při $80 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ [27].

V našem experimentu je na první pohled znát, že tento kmen byl schopen růstu při všech osvětleních, ale viditelný trend zde nenacházíme. Při $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ dochází k nejvyššímu nárůstu kultury na úkor ostatních metabolitů. Jako neoptimálnější vzhledem k výtěžkům téměř všech metabolitů se jeví $600 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, kde celkové karotenoidy dosahovaly 4 mg/l, 4,4 mg/l luteinu a 9 mg/l fytosterolů. Při $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ byly dosaženy nejvyšší koncentrace chlorofylu A 3 mg/l, 1,3 mg/l chlorofylu B, 1,8 mg/l β -karotenu. Tyto výtěžky byly vyšší vzhledem k rychlejšímu nárůstu biomasy.

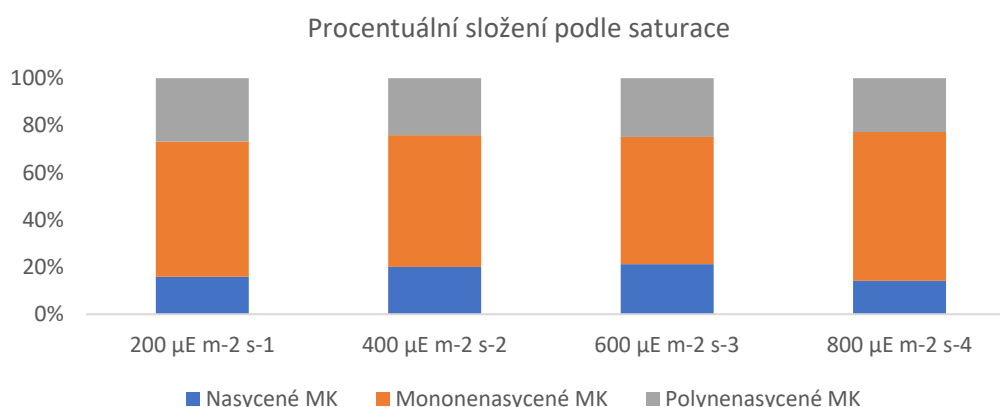
Lipidy v tomto experimentu vykazovaly sníženou akumulaci vlivem zvyšující se intenzity světelného záření viz Obrázek 86. Při zvolených podmínkách (200 a $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) docházelo k poměrně vysokým akumulacím (až 40 % biomasy). Výsledky jsou velice pozoruhodné a tyto podmínky by šlo eventuálně použít v budoucnu při biotechnologické produkci biopaliv. Nejvyšší výtěžek vzhledem k nárůstu biomasy je 0,56 g/l. Když vyhodnotíme profil MK, z grafického znázornění (Obrázek 87) je viditelná změna pouze při vyšší intenzitě $800 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, kde dochází ke zvýšení MUFA.



Obrázek 85. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 25°C v závislosti na aplikaci světelného stresu u kmene *Chlorella saccharophila*



Obrázek 86. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 25 °C v závislosti na aplikaci světelného stresu u kmene *Chlorella saccharophila*



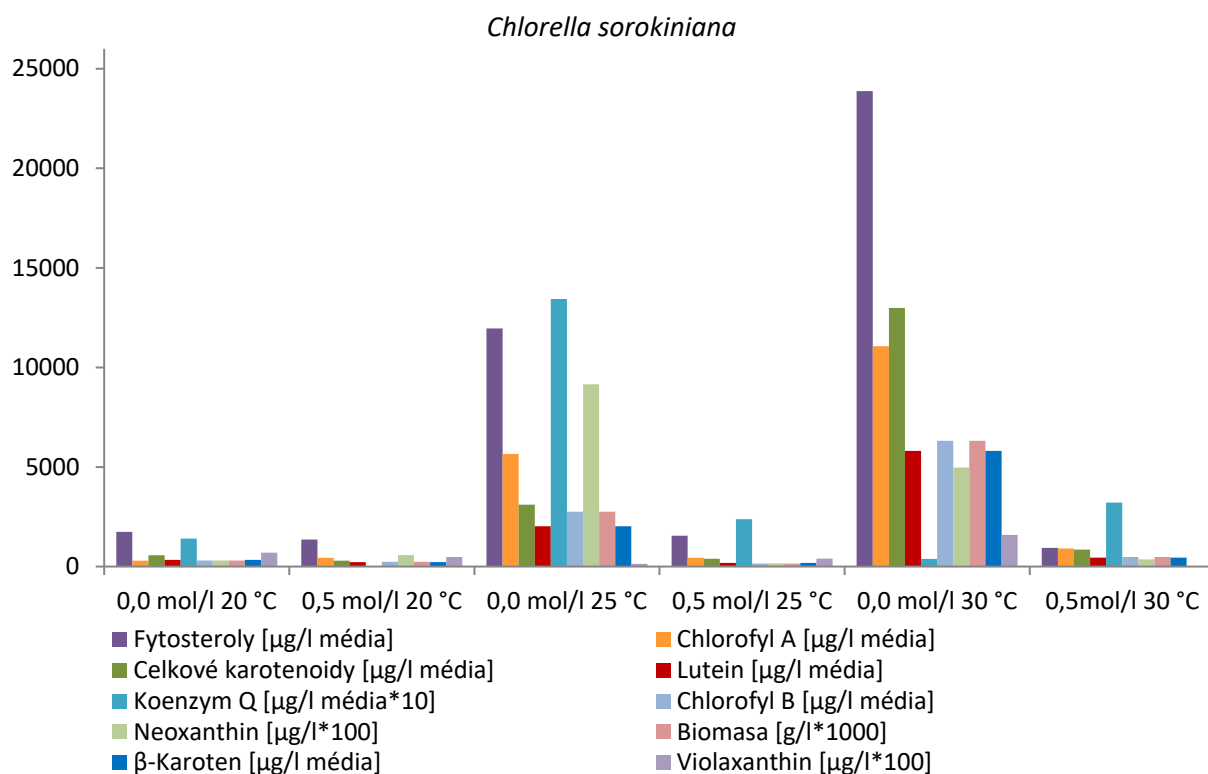
Obrázek 87. Grafické znázornění procentuálního zastoupení zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *Chlorella saccharophila* v závislosti na světelném stresu

5.2.4 Kmen *Chlorella sorokiniana*

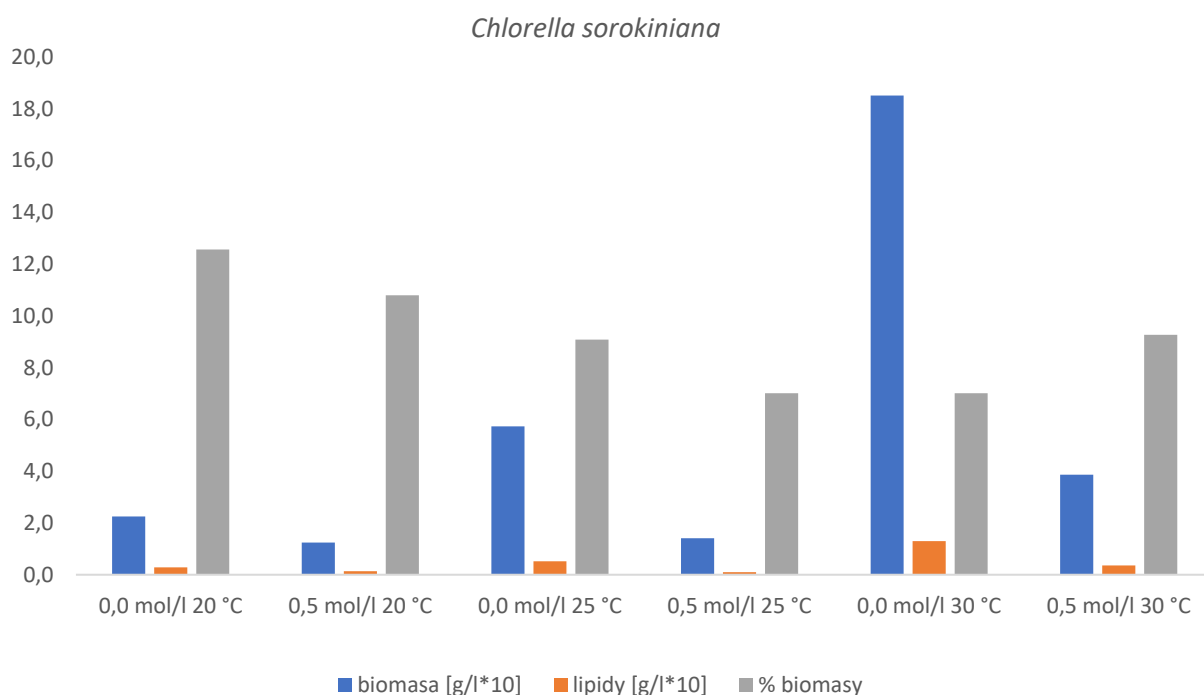
5.2.4.1 Aplikace teploty a solného stresu

Ačkoli literatura uvádí široké rozmezí teplot pro existence rodu *Chlorella*, experimentem se prokázalo, že teplota 15 °C byla pro růst tohoto kmene letální – viz Obrázek 88 [75, 76]. Při teplotě 20 °C byla schopna kultura přežít, ale s velmi nízkým nárůstem a produkcí vybraných metabolitů. Solný stres nad 1,0 mol/l, jak bylo výše uvedeno, byl rovněž letální. Pokud aplikujeme velmi slabý stres 0,5 mol/l NaCl, byly buňky schopny přežít, ale s velmi nízkým nárůstem. Neoptimálnější teplota se jeví z hlediska nárůstu biomasy (0,63 g/l) 30 °C, kde jsou výtěžky celkových karotenoidů 13,0 mg/l, luteinu 5,8 mg/l, 11,1 mg/l chlorofylu A, 6,6 mg/l chlorofylu B a 5,8 mg/l β-karotenu. Jak můžeme vidět, při optimální teplotě dochází k velmi nízké produkci koenzymu Q, která je ale zvýšená při teplotě 25 °C s výtěžkem 1,3 mg/l.

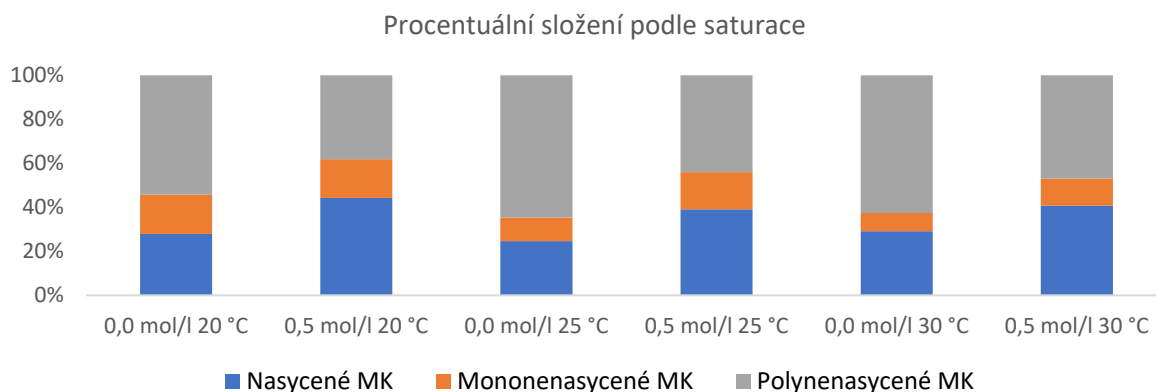
Tento rod vykazuje velmi nízké produkce lipidů – viz (Obrázek 89), kde s rostoucí teplotou dochází ke snížení akumulace lipidů v buňce. Při optimu dochází k výtěžku pouze 0,1 g/l. Při osmotickém stresu je vidět jistý trend oproti kontrole. Chlorid sodný indukuje a posouvá produkci spíše k MUFA a SFA. Pro ukázkou jsou níže (viz - Obrázek 91) zobrazeny růstové křivky kmene *Chlorella sorokiniana* při různých teplotách.



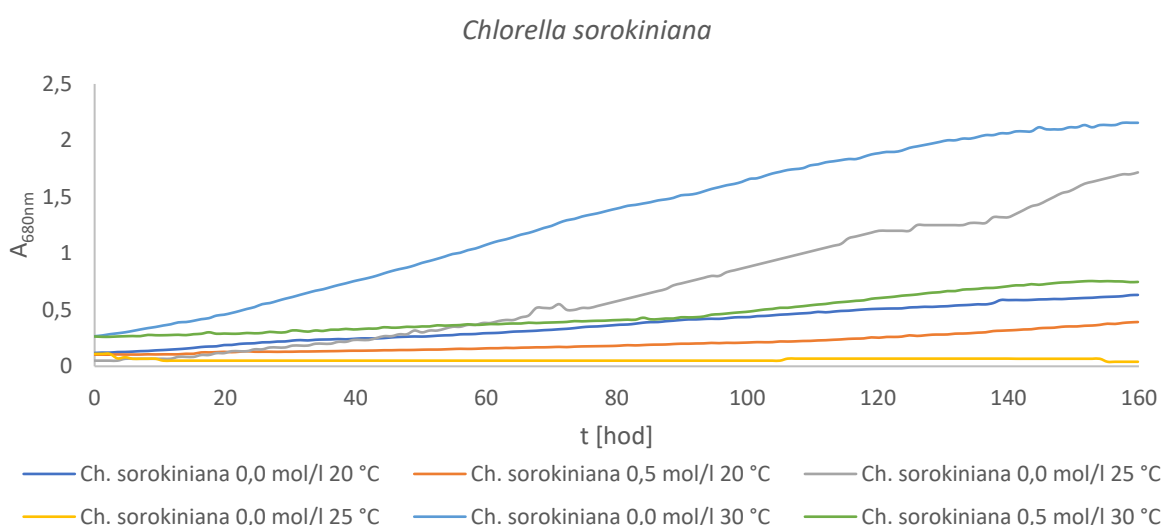
Obrázek 88. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 15 °C, 20 °C, 25 °C a 30 °C v závislosti na aplikaci solného stresu u kmene *Chlorella sorokiniana*



Obrázek 89. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 15 °C, 20 °C, 25 °C a 30 °C v závislosti na aplikaci solného stresu u kmene *Chlorella sorokiniana*



Obrázek 90. Grafické znázornění procentuálního zastoupení zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *Chlorella sorokiniana*

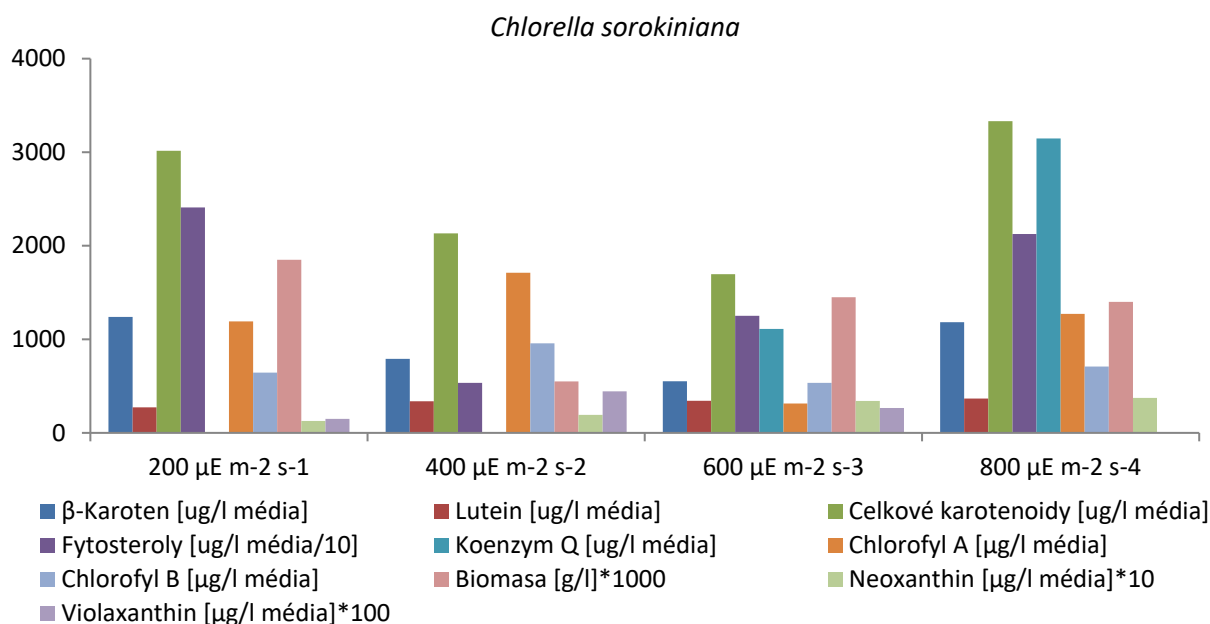


Obrázek 91. Grafická závislost absorpance (680 nm) kmene *Chlorella sorokiniana* při různých teplotách

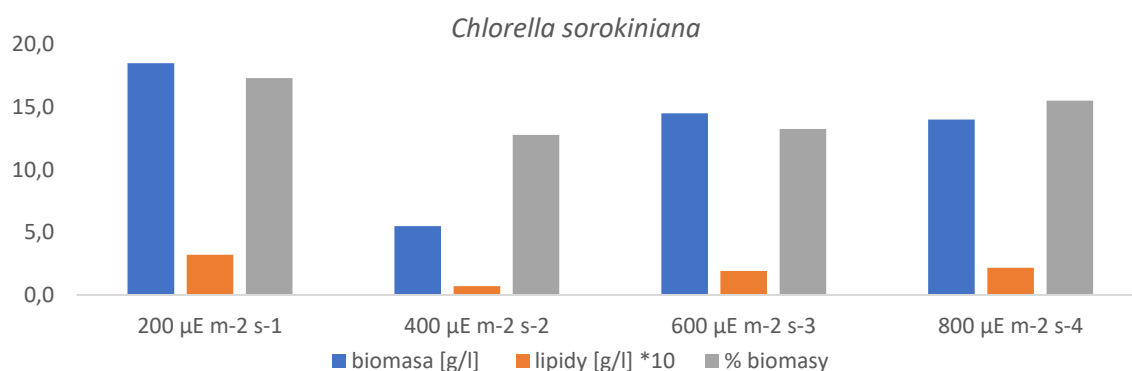
5.2.4.2 Aplikace světelného stresu

U kmene *Chlorella sorokiniana* vidíme viz (Obrázek 92) obdobný trend jako u *Chlorella saccharophila*. Je patrné, že kmen vykazuje velmi širokou toleranci růstu při různých intenzitách světelného záření, jako je uváděno v literární části. Nejvyšší nárůst kultury pozorujeme při $200 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (1,9 g/l), který se poté snižuje při $400 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a následně při dalších vyšších intenzitách opětovně narůstá (1,45 g/l). Nejvyšší produkci téměř všech metabolitů pozorujeme při $800 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ s výtěžky celkových karotenoidů 3,3 mg/l, 3,2 mg/l koenzymu Q a 0,36 mg/l luteinu. Při $200 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ sledujeme zvýšenou produkci fytosterolů 24,1 mg/l a 1,2 β -karotenu. Co se týče produkce chlorofylu, tak nejvíce byla indukována kultivace při aplikaci $400 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ s výtěžkem 1,7 mg/l chlorofylu A a 1,0 mg/l chlorofylu B.

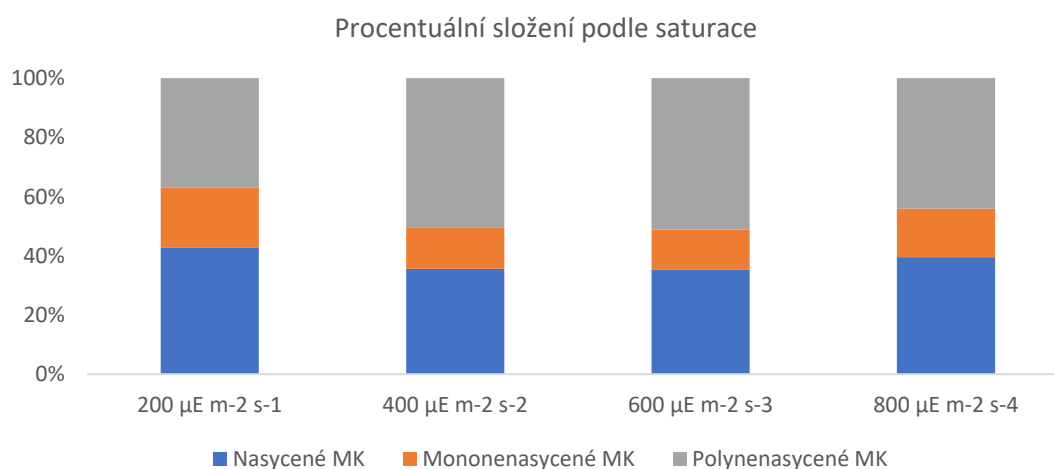
V případě akumulace lipidů nedochází k velké podobnosti s kmenem *Chlorella saccharophila*. Docházelo k nižším akumulacím, které dosahovaly maxima při $200 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ s 17,3 % lipidů v biomase. Pokud vztáhneme výtěžek lipidů na nárůst celkové biomasy, dosahuje 0,3 g/l lipidů v médiu. Z grafu nasycenosti MK je patrné (viz Obrázek 94), že stres nevykazuje přílišnou změnu. Při zvyšující se intenzitě záření se mírně navyšuje podíl PUFA.



Obrázek 92. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 25 °C v závislosti na aplikaci světelného stresu u kmene *Chlorella sorokiniana*



Obrázek 93. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 25 °C v závislosti na aplikaci světelného stresu u kmene *Chlorella sorokiniana*



Obrázek 94. Grafické znázornění procentuálního zastoupení zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *Chlorella sorokiniana* v závislosti na světelném stresu

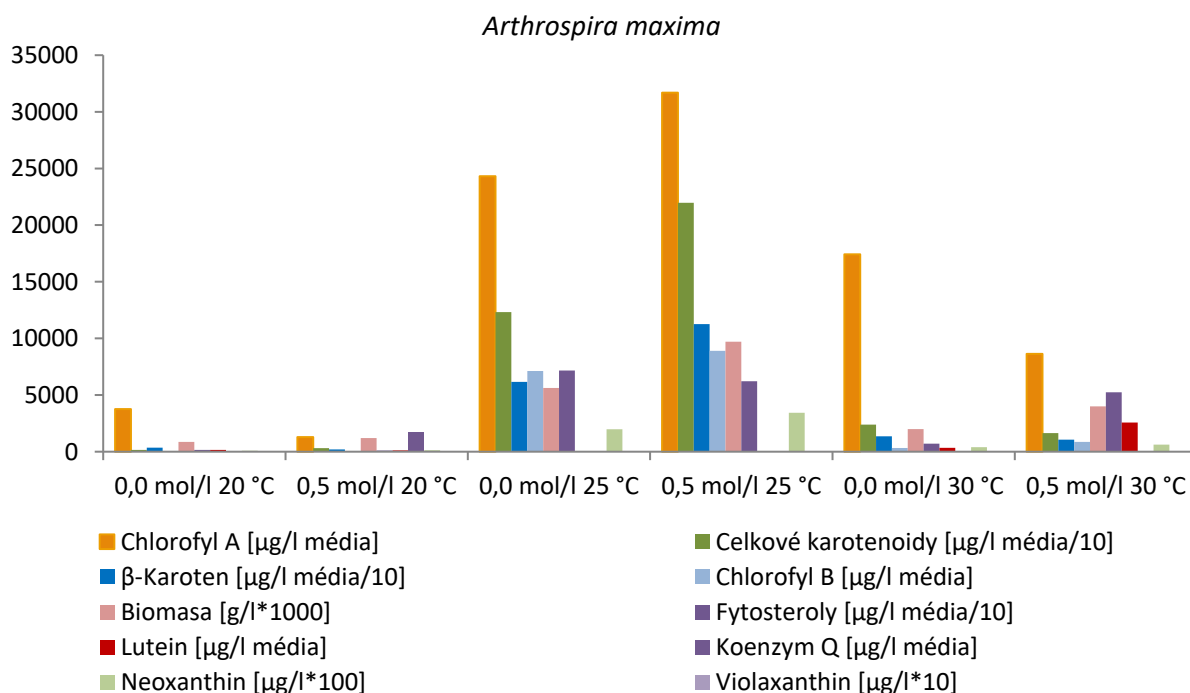
5.2.5 Kmen *Arthrospira maxima*

5.2.5.1 Aplikace teploty a solného stresu

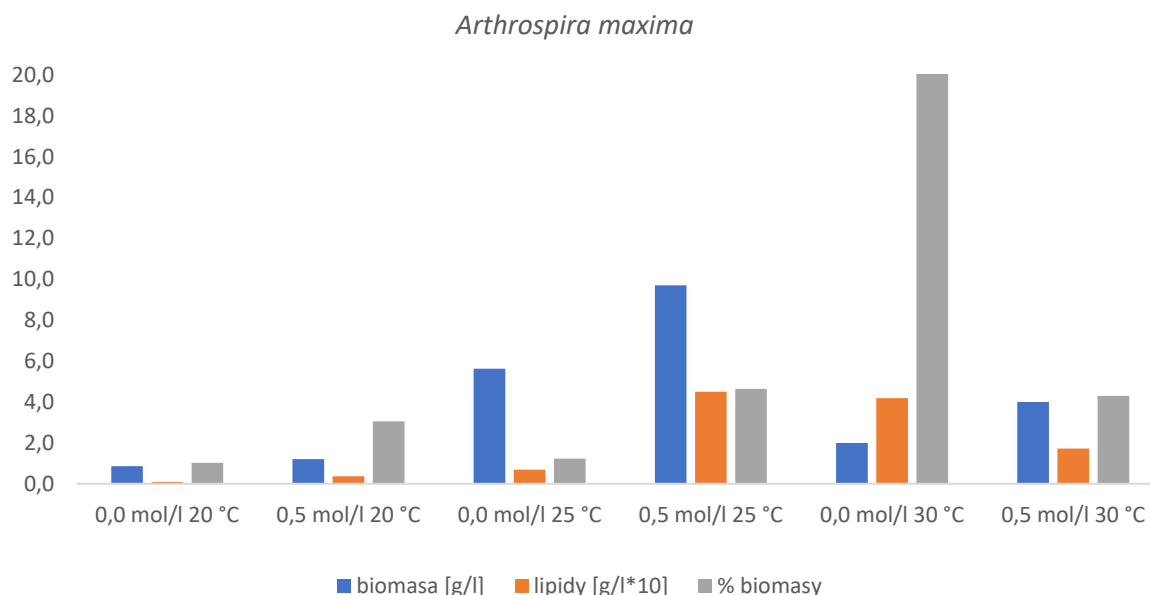
Z grafického znázornění (Obrázek 95) vyplývá, že mírný solný stres (0,5 mol/l NaCl) indukuje růst kultury. Literatura uvádí, že tento kmen je schopen růst v širokém rozmezí teplot a při vysokých koncentracích solí [42]. Uváděné teploty byly dokonce i pod 15 °C a nad 30 °C (optimum 35 °C a 37 °C), ale v tomto experimentu se zdá být nejvhodnější teplota 25 °C při aplikaci mírného solného stresu. Můžeme předpokládat, že v jiných studiích se jednalo o kmeny adaptované na růst v extrémních teplotách a podmínkách.

Tento kmen vykazoval velmi vysoké nárůsty kultury (až 9,7 g/l), které by se daly srovnávat s kvasinkami. Pozorujeme zde velmi vysoké výtěžky 31,6 mg/l chlorofylu A, 8,9 mg/l chlorofylu B, 22 mg/l celkových karotenoidů, 6,2 mg/l β -karotenu. Naopak docházelo k inhibici tvorby ergosterolu a koenzymu Q, která obsahuje vyšší výtěžky u kontrolního média (1,3 mg/l koenzymu Q a 71,6 mg/l fytosterolů). Vysoká teplota a solný stres indukoval tvorbu luteinu (2,6 mg/l).

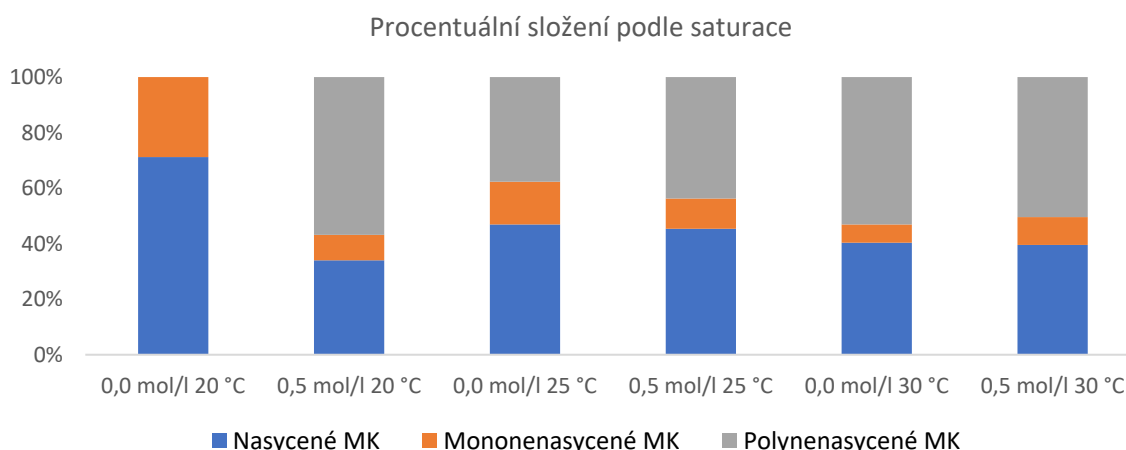
Sledovaný kmen nevykazoval zvýšené lipidotvorné schopnosti, jak vidíme z grafu Obrázek 96. Pouze teplota 30 °C indukovala buňky ke zvýšené schopnosti akumulovat lipidy (21 % biomasy), ačkoliv jsou zde velmi nízké nárůsty biomasy a ostatních metabolitů. Nejvyšší dosažený výtěžek je pouze 0,4 g/l. Profil nasycenosti MK se nemění velmi výrazně, buňky jsou schopny akumulovat až 56 % PUFA. Při extrémním stresu (velmi nízká teplota), buňky mění aktivitu pro produkci spíše SFA a MUFA viz Obrázek 97.



Obrázek 95. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 15 °C, 20 °C, 25 °C a 30 °C v závislosti na aplikaci solného stresu u kmene *Arthrospira maxima*



Obrázek 96. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 15 °C, 20 °C, 25 °C a 30 °C v závislosti na aplikaci solného stresu u kmene *Arthrospira maxima*

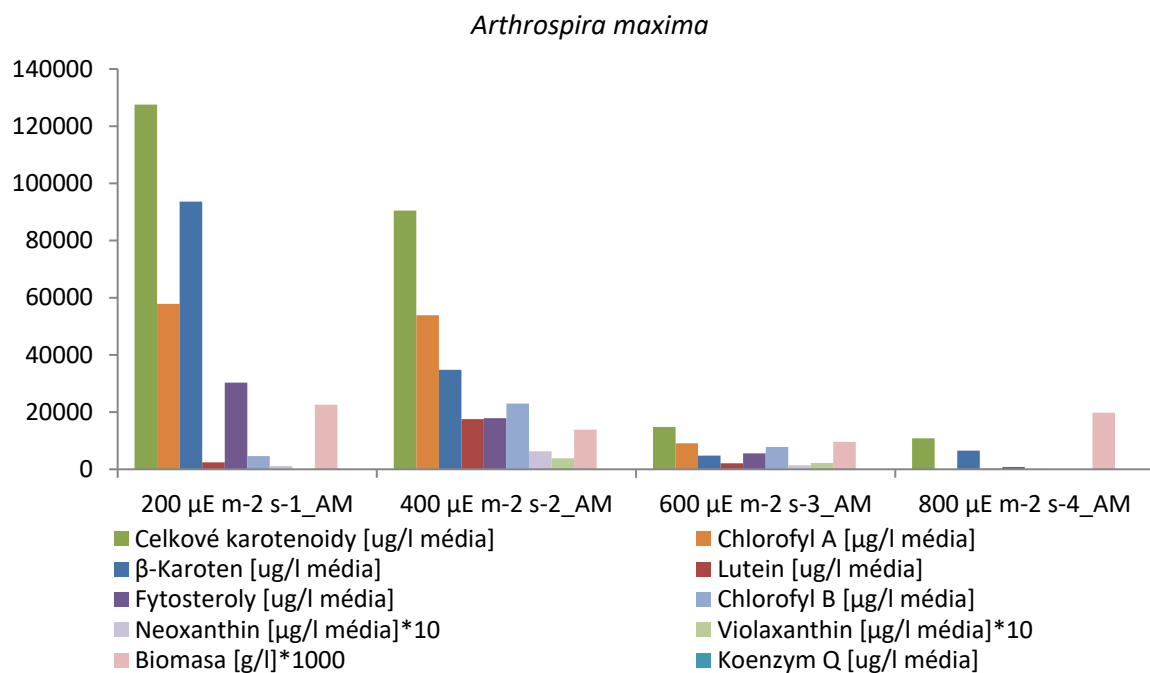


Obrázek 97. Grafické znázornění procentuálního zastoupení zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *Arthrospira maxima*

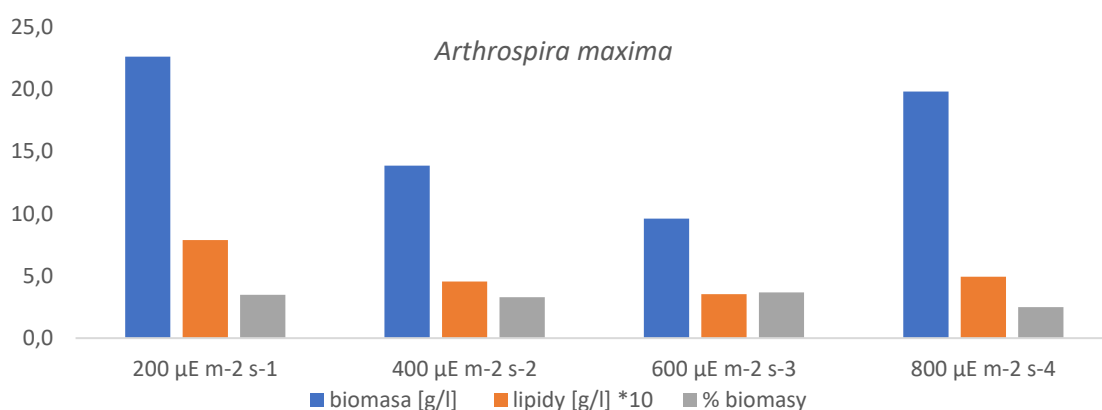
5.2.5.2 Aplikace světelného stresu

Při kultivaci kmene *Arthrospira maxima* je na první pohled rapidně znatelný pokles všech metabolitů při zvyšující se intenzitě světelného záření viz Obrázek 98 (kromě intenzity při $800 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ nárůst kultury). Co se týče biomasy, nejvyšší nárůst byl pozorován při $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, kde dosahujeme výtěžnosti až 22,6 g/l. Při těchto podmínkách pozorujeme také nejlepších výtěžků (128 celkových karotenoidů, 57,8 mg/l chlorofylu A, 4,6 mg/l chlorofylu B a 93,6 mg/l β -karotenu). Jak si můžeme povšimnout, chlorofyl B (23 mg/l) a lutein (17,5 mg/l) byl indukován vyšší intenzitou světelného záření.

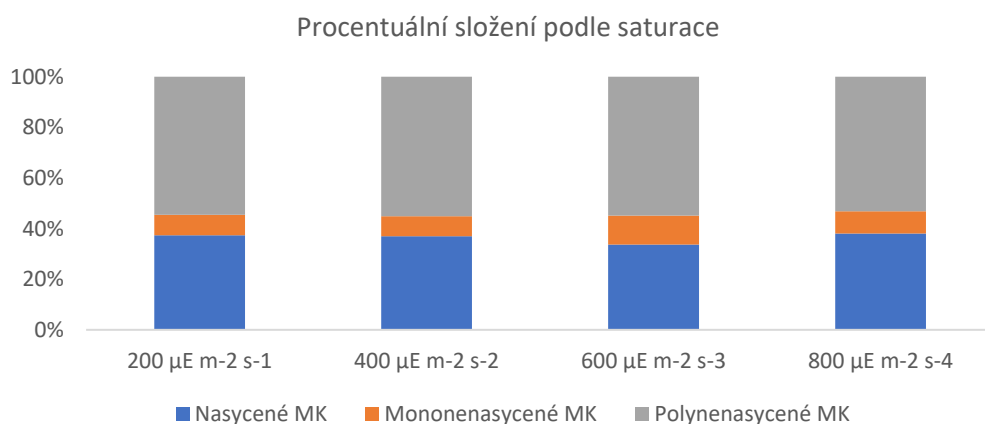
Kmen *Arthrospira maxima* nevykazuje příliš lipidotvorné schopnosti, které se ani vlivem světelného záření příliš nemění (viz Obrázek 98). Vzhledem k vysokým nárůstům biomasy výtěžek lipidů 0,8 g/l je nízký. Pokud porovnáme světelný stres na profil zastoupení MK, není viditelná znatelná změna.



Obrázek 98. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 25 °C v závislosti na aplikaci světelného stresu u kmene *Arthrospira maxima*



Obrázek 99. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 25 °C v závislosti na aplikaci světelného stresu u kmene *Arthrospira maxima*



Obrázek 100. Grafické znázornění procentuálního zastoupení zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *Arthrospira maxima* v závislosti na světelném stresu

5.2.6 Kmen *Botryococcus brauni*

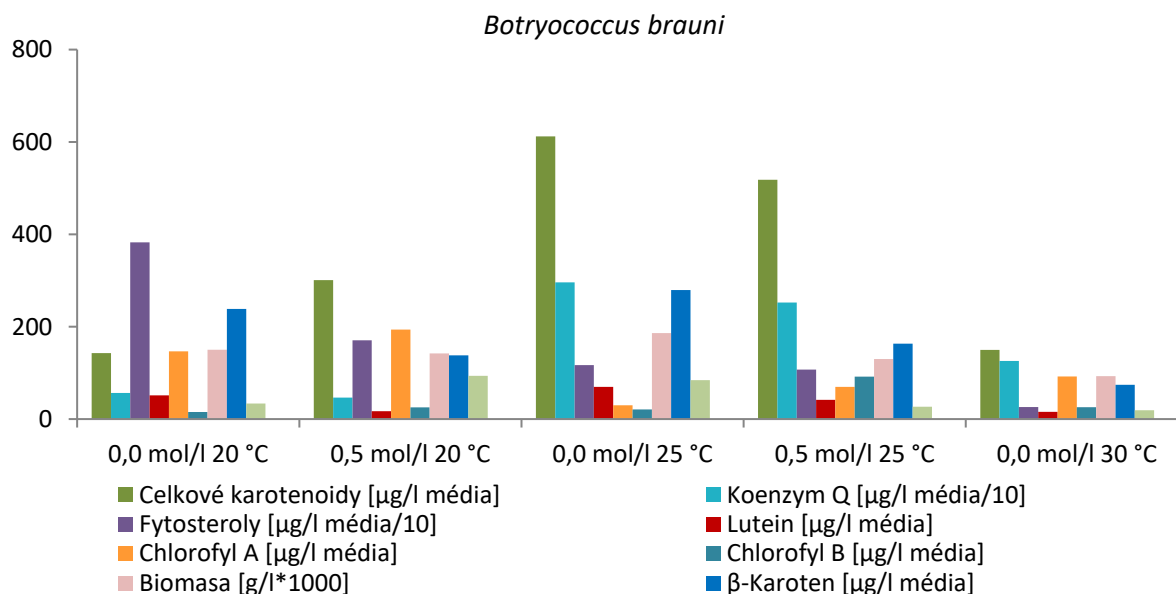
5.2.6.1 Aplikace teploty a solného stresu

Kmen *Botryococcus brauni* je známý svým pomalým růstem a je to hlavní limitující faktor pro využití v biotechnologické produkci. Z grafického znázornění viz Obrázek 101 se potvrdil velmi nízký nárůst kultury po 7 dnech kultivace, kde maximum bylo 0,186 g/l (25 °C). Teplota 15 °C byla pro kmen letální a rovněž i aplikace solného stresu nad 1 mol/l NaCl. Kultura dokázala tento stres tolerovat pouze při 20 °C a 25 °C (0,5 mol/l).

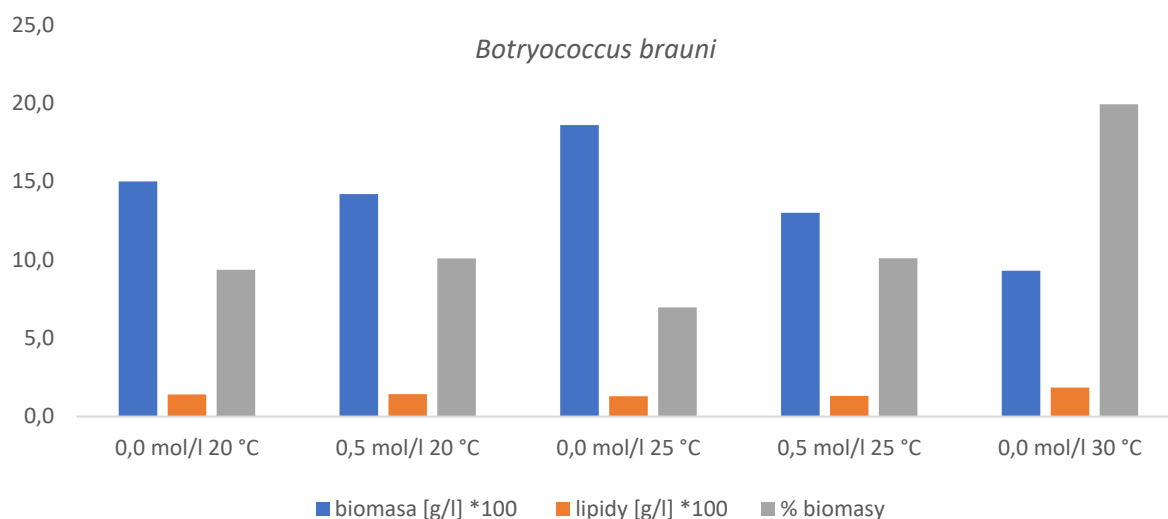
Na první pohled je znát, že v tomto experimentu vypadá jako optimální teplota kmene *Botryococcus brauni* 25 °C. Literatura uvádí teplotu 23 °C, která nebyla experimentálně vyzkoušena, proto by bylo vhodné prozkoumat produkci v jeho přesném optimu [26]. Vzhledem k velmi nízkým nárůstům biomasy nebyly výtěžky jednotlivých metabolitů příliš vysoké. Pokud se zaměříme na produkci ergosterolu, je zajímavé, že kultura měnila aktivity biosyntetické dráhy, kde fytosteroly dosahovaly svého maxima (3825 µg/l) při nízkých teplotách a postupně se obsah snižoval se zvyšující se teplotou. Podobný trend pozorujeme i u chlorofylu A, kde vidíme zvýšenou produkci mimo optima, kde solný stres indukoval produkci (194 µg/l). V případě chlorofylu B pozorujeme rovněž zvýšenou produkci vlivem NaCl. U optima je výtěžek celkových karotenoidů pouze 600 µg/l, 30 µg/l koenzymu Q a 279 µg/l β-karotenu.

Přestože literární zdroje uvádí, že kmen *Botryococcus brauni* je vynikajícím producentem lipidů až do 65 % své hmotnosti a je slibným kmenem pro budoucí výrobu biopaliv, tak z Obrázek 102 vidíme u našeho kmene nižší produkci lipidů [25]. Naš kmen nevykazoval vysoké akumulace lipidů (pouze 20 % biomasy), ale můžeme předpokládat, že obsahoval jiné uhlovodíky, které nebyly v experimentu analyzovány.

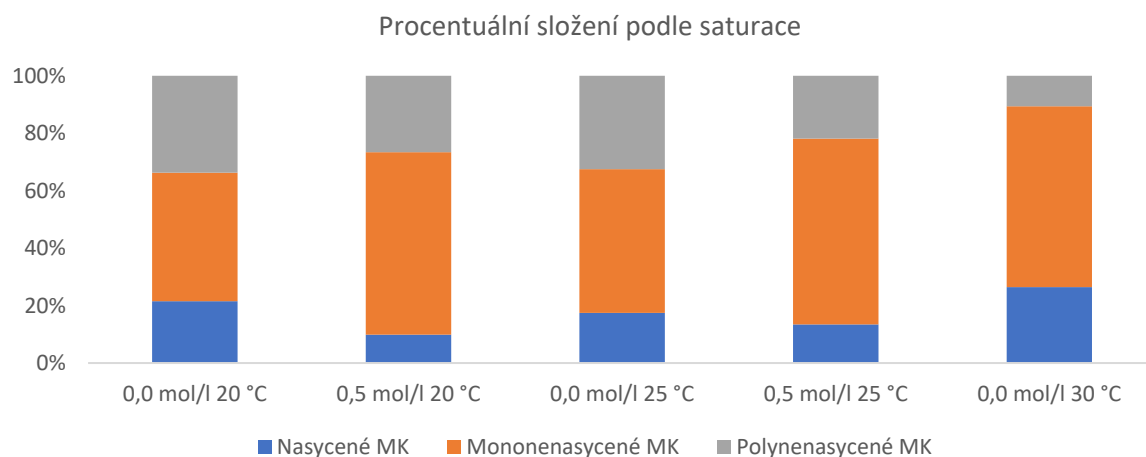
Pokud se zaměříme na profil zastoupení MK, z grafu Obrázek 103 je viditelný trend, kde se zvyšující teplotou se snižuje obsah PUFA, a naopak zvyšuje MUFA a SFA. Při aplikaci osmotického stresu dochází k zesílnění efektu produkce MUFA.



Obrázek 101. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 15 °C, 20 °C, 25 °C a 30 °C v závislosti na aplikaci solného stresu u kmene *Botryococcus brauni*



Obrázek 102. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 15 °C, 20 °C, 25 °C a 30 °C v závislosti na aplikaci solného stresu u kmene *Botryococcus brauni*

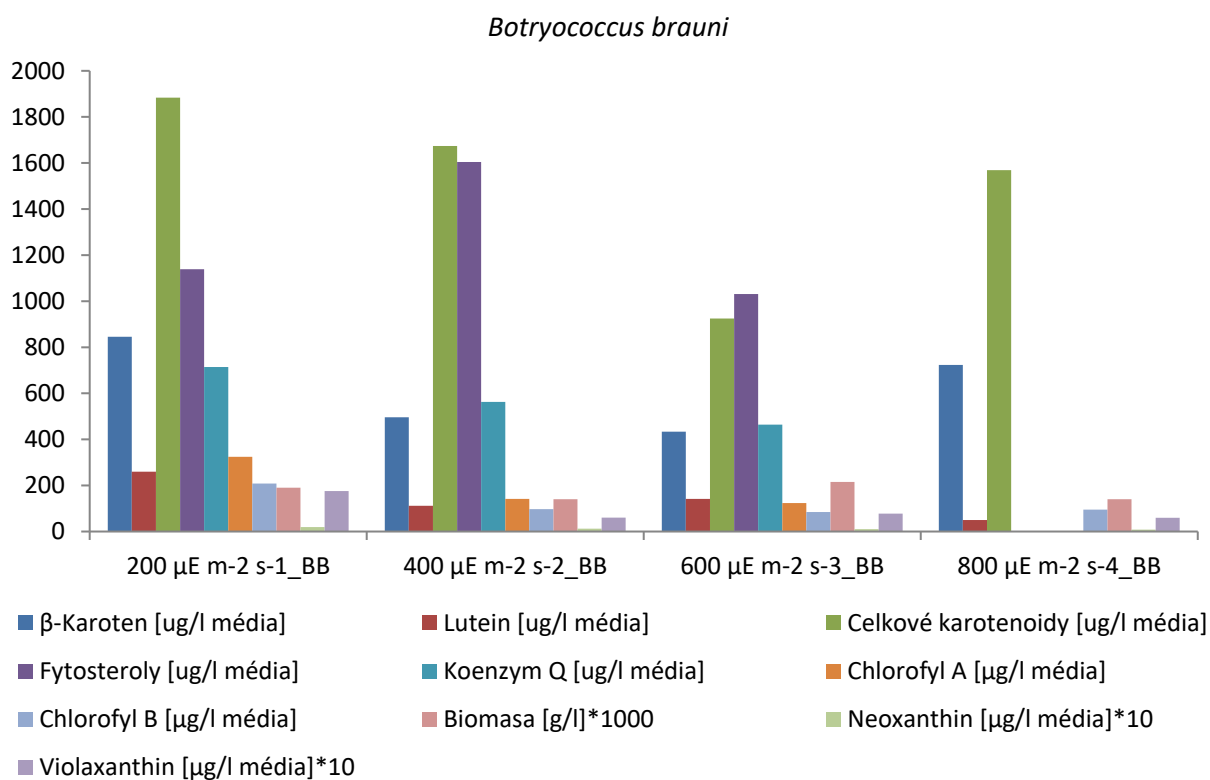


Obrázek 103. Grafické znázornění procentuálního zastoupení zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *Botryococcus brauni*

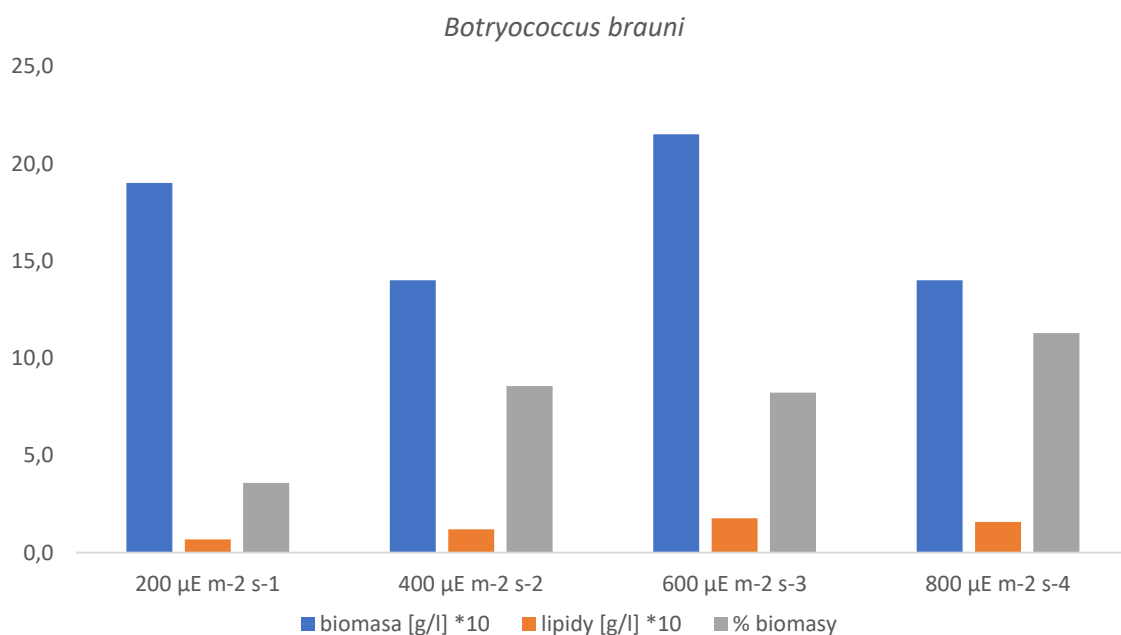
5.2.6.2 Aplikace světelného stresu

Z grafického znázornění kmene *Botryococcus brauni* je vidět, že nejvyšší nárůst biomasy je při $600 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (0,215 g/l) a při $200 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (0,190 g/l). Co se týče výtěžnosti sledovaných metabolitů, nejvyšší produkce jsou pozorovány při nejnižším osvětlení (viz Obrázek 104), které při zvyšující se intenzitě záření postupně klesaly. Můžeme předpokládat, že docházelo k mírné inhibici fotosyntézy. Celkové karotenoidy při této intenzitě dosahovaly 1,9 mg/l, 0,85 mg/l β -karotenu, 0,259 mg/l luteinu, 0,7 mg/l koenzymu Q, 324 μg /l chlorofylu A a 208 μg /l chlorofylu B.

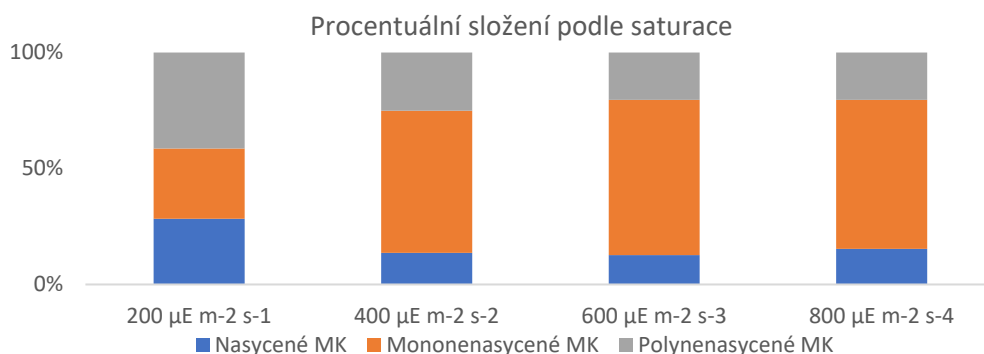
Jako jsme pozorovali u solného a teplotního stresu, ani v tomto případě nedochází k vysokým akumulačním schopnostem kmene. Nejvyšší dosažená hodnota obsahu lipidů je při $600 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ s výtěžností 21,5 %. Můžeme si ale povšimnout, že se zvyšující se intenzitou dochází ke změně profilu MK, kde se akumulují spíše MUFA.



Obrázek 104. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 25 °C v závislosti na aplikaci světelného stresu u kmene *Botryococcus brauni*



Obrázek 105. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 25 °C v závislosti na aplikaci světelného stresu u kmene *Botryococcus brauni*



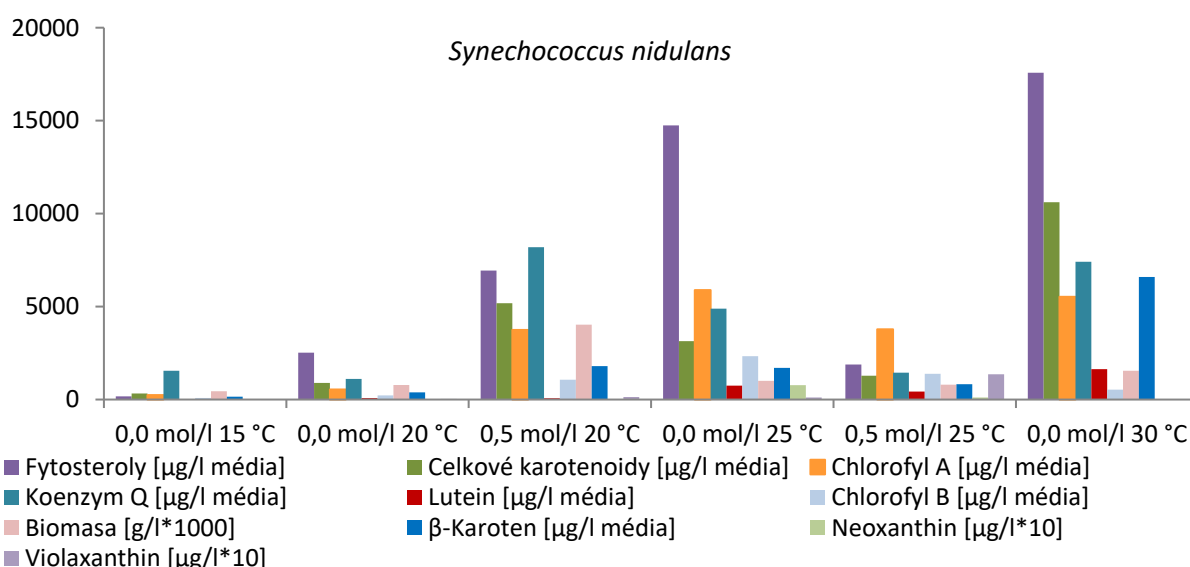
Obrázek 106. Grafické znázornění procentuálního zastoupení zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *Botryococcus brauni* v závislosti na světelném stresu

5.2.7 Kmen *Synechococcus nidulans*

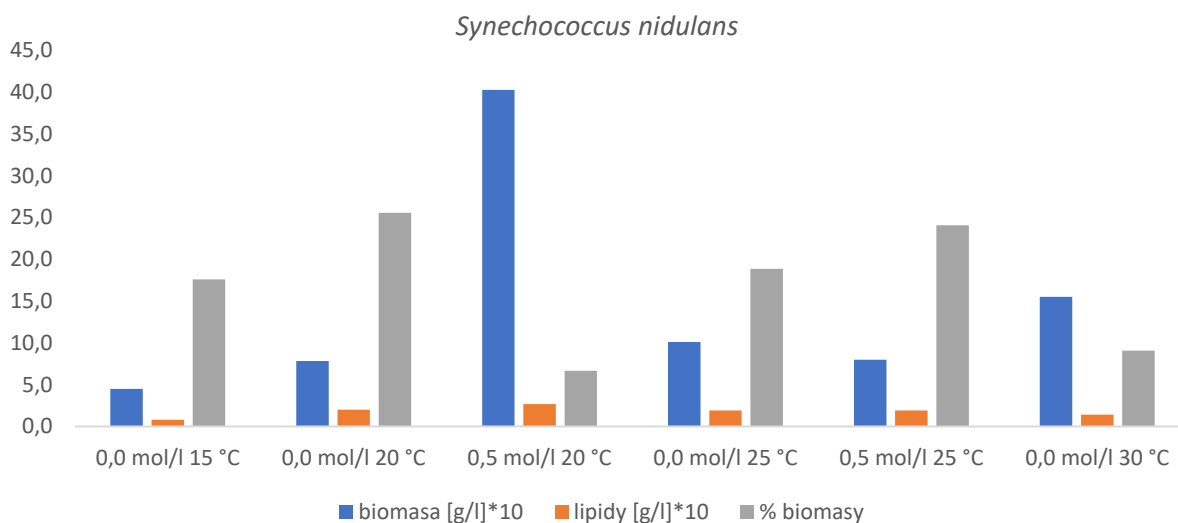
5.2.7.1 Aplikace teploty a solného stresu

Při kultivaci kmene *Synechococcus nidulans* bylo zjištěno, že toleroval teplotu od 15 °C až do 30 °C viz (Obrázek 107). Literatura uvádí skutečnost, že rod *Synechococcus* akceptuje vysoké teploty a je schopen růst i v horkých pramenech [40, 41]. V budoucích experimentech by se eventuálně mohl vyzkoušet stres s vyšší teplotou. Co se týče zvýšeného osmotického stresu, tak kultura byla schopna sůl akceptovat pouze v koncentraci 0,5 mol/l při 20 °C a 25 °C, další koncentrace měly letální efekt. Můžeme si povšimnout, že solný stres měl zvýšený efekt na růst kultury při 20 °C, ale docházelo ke snížené produkci téměř všech metabolitů (kromě koenzymu Q 8,2 mg/l). Další literární zdroje tvrdí, že tento rod je schopen růstu při vyšších koncentracích solí, ale musí se jednat o kmene adaptované na tento stres [40, 41]. Nejvyšší produkce všech metabolitů jsou pozorovány u teploty 30 °C, kde výtěžek celkových karotenoidů je 10,6 mg/l, 176 mg/l fytosterolů, 5,5 mg/l chlorofylu A, 1,6 mg/l luteinu, 6,6 mg/l.

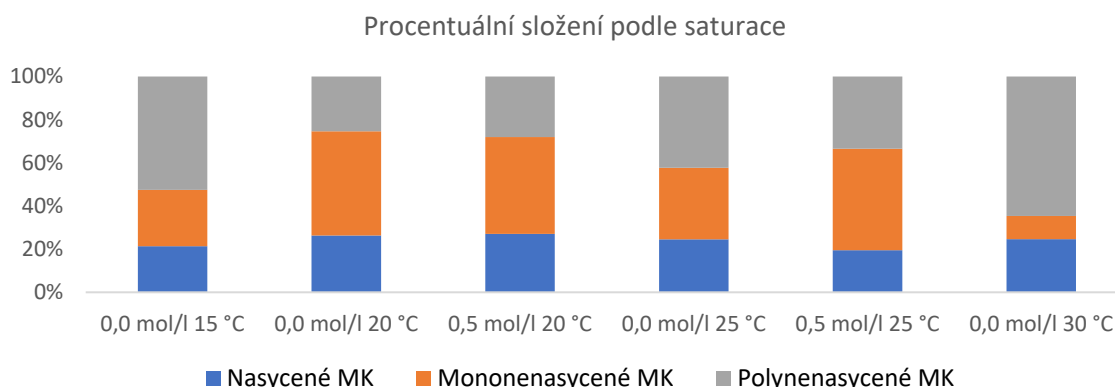
Z hlediska akumulace lipidů můžeme pozorovat, že se zvyšujícím se nárůstem biomasy dochází ke snížení akumulace lipidů. Nejvyšší pozorovaná akumulace je při 20 °C, kde obsah lipidů činil 25,5 % biomasy. Vzhledem k relativně nízkým nárůstům biomasy výtěžnost není příliš vysoká. Při zhodnocení profilu MK není viditelný jednoznačný trend. Při nižších a vyšších teplotách dochází spíše k akumulaci PUFA (viz Obrázek 109).



Obrázek 107. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 15 °C, 20 °C, 25 °C a 30 °C v závislosti na aplikaci solného stresu u kmene *Synechococcus nidulans*



Obrázek 108. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 15 °C, 20 °C, 25 °C a 30 °C v závislosti na aplikaci solného stresu u kmene *Synechococcus nidulans*



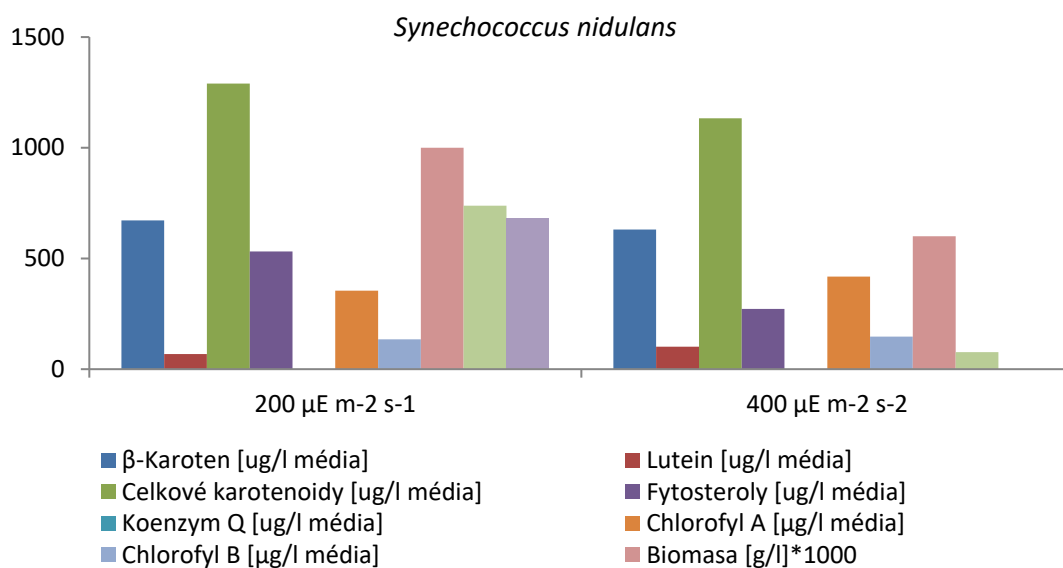
Obrázek 109. Grafické znázornění procentuálního zastoupení zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *Synechococcus nidulans*

5.2.7.2 Aplikace světelného stresu

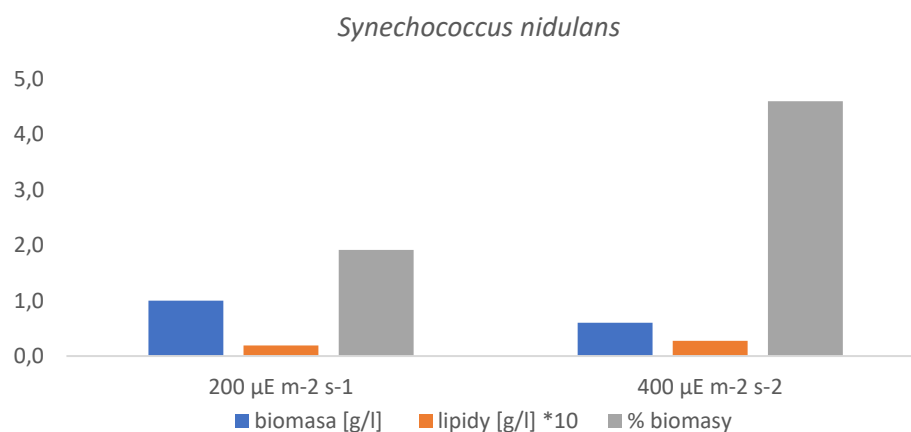
V další části experimentu byl sledován světelný stres na kmen *Synechococcus nidulans*. Ačkoli experimentální data z literatury tvrdí, že kmen se dokáže adaptovat na různé intenzity světelného záření, v našem případě intenzita nad $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ byla letální. Můžeme předpokládat, že se jednalo o různě adaptované kmeny [40, 41].

Z grafu Obrázek 110 je viditelné, že tato kultivace nedosahovala příliš vysoké produkce. Nejvyšší dosažený výtěžek byl při $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (1,0 g/l biomasy, 1,3 mg/l celkových karotenoidů, 0,67 mg/l β -karotenu, 531 $\mu\text{g/l}$ fytosterolů. Při vyšší intenzitě $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ dosahoval vyšší výtěžnost chlorofylu A (418 $\mu\text{g/l}$), chlorofylu B (147 $\mu\text{g/l}$) a luteinu (102 $\mu\text{g/l}$). S určitou pravděpodobností lze předpokládat, že celkové nižší výtěžky a neschopnost tolerovat intenzitu světelného záření mohla zapříčinit kultivace při 25 °C. Ve výše uvedené kultivaci kmen *Synechococcus nidulans* akceptoval spíše teplotu kolem 30 °C (vyšší produkce lipofilních metabolitů).

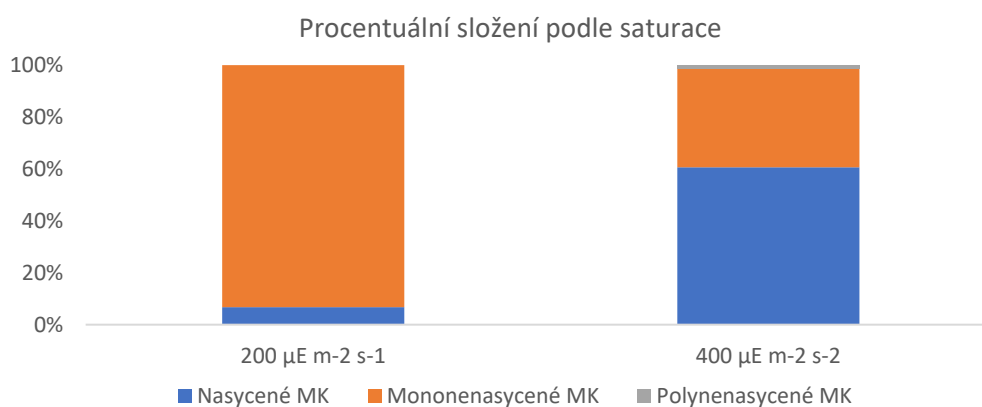
Ze stanovených lipidů viz Obrázek 111 vidíme, že buňky vykazovaly velmi nízkou akumulaci v biomase, která se zvyšovala vlivem zvýšené intenzity světla. Je velmi zajímavé, že buňky viditelně měnily profil MK v buňce. Při nižší intenzitě docházelo spíše k produkci MUFA – až 93 % a při $400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ se produkovalo až 60 % MUFA.



Obrázek 110. Grafické znázornění produkce vybraných metabolitů při teplotě 25 °C v závislosti na aplikaci světelného stresu u kmene *Synechococcus nidulans*



Obrázek 111. Grafické znázornění produkce lipidů při teplotě 25 °C v závislosti na aplikaci světelného stresu u kmene *Synechococcus nidulans*



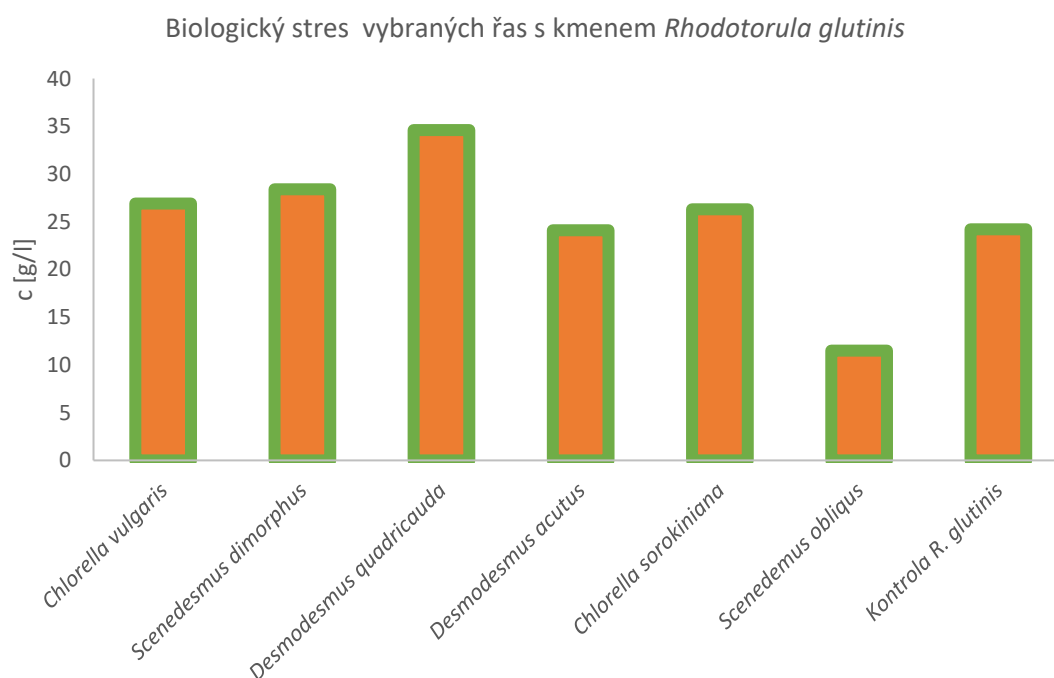
Obrázek 112. Grafické znázornění procentuálního zastoupení zastoupení mastných kyselin v lipidech dle stupně saturace u kmene *Synechococcus nidulans* v závislosti na světelném stresu

5.3 Biologické stresy – ko-kultivace kvasinek a řas

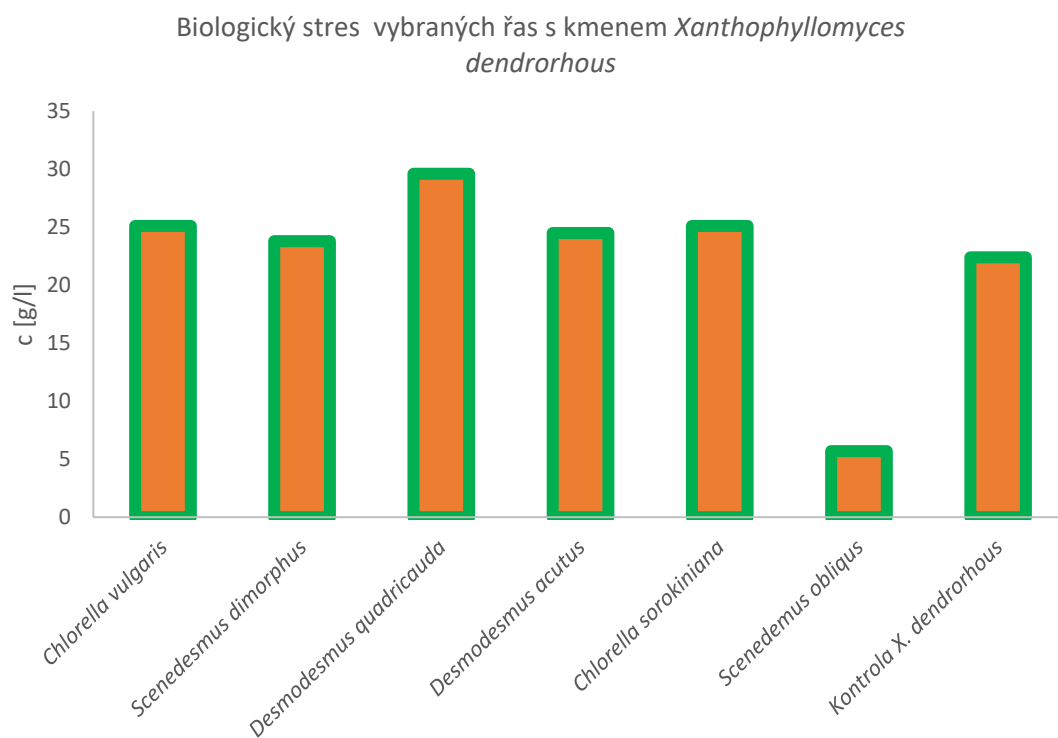
Jednalo se o pilotní experimenty, které budou předmětem dalších odborných prací. V této fázi bylo vyzkoušeno, zdali jednotlivé kmeny řas a karotenogenních kvasinek jsou schopny vzájemné kooperace. Jednalo se o kmeny kvasinek *Rhodotorula glutinis* a *Xanthophyllomyces dendrorhous*. V případě řas se jednalo o kmeny *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Desmodesmus acutus*, *Scenedesmus dimorphus*, *Desmodesmus quadricauda*, *Scenedesmus obliquus* a *Synechococcus nidulans*.

Kultivace měla letální účinky pro kmeny *Synechococcus nidulans*. Kmeny pravděpodobně neakceptovaly médium nebo nezvládaly společné prostředí s výše uvedenými kmeny kvasinek. Obdobně při kultivaci kmene *Scenedesmus obliquus* docházelo k inhibici růstu. V průběhu kultivace byla sledována hodnota pH média, která se neměnila (pH = 5,4).

Z grafického znázornění vidíme, že docházelo k pozitivnímu ovlivnění růstu kvasinkové kultury při přidavku řas (viz 0 a Obrázek 114). V případě obou kvasinkových kmenů docházelo ve většině případů k pozitivnímu ovlivnění růstu kultury. U kmene *Rhodotorula glutinis* a *Xanthophyllomyces dendrorhous* se jeví jako nejlepší kmen pro ko-kultivace *Desmodesmus quadricauda*. V případě kmene *Scenedesmus obliquus* dochází k rapidnímu snížení produkce celkové biomasy u obou kvasinkových kmenů. Kmen *Desmodesmus acutus* vykazoval pozitivní efekt na růst biomasy pouze u kokultivace s kmenem *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tyto experimenty představují začátek problematiky, která bude pokračovat v dalších diplomových a bakalářských pracích.



Obrázek 113. Grafická závislost koncentrace biomasy při biologickém stresu u kmene *Rhodotorula glutinis*



Obrázek 114. Grafická závislost koncentrace biomasy při biologickém stresu u kmene *Xanthophyllomyces dendrorhous*

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo srovnání produkce vybraných metabolitů kvasinkami, mikrořasami a sinicemi kultivovanými v podmínkách externího stresu za účelem jeho budoucího biotechnologického využití. Sledovanými kmeny kvasinek byly *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporidiobolus pararoseus* a *Cystofilobasidium macerans*. V případě řasových a sinicových kultur se jednalo o *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella saccharophila*, *Botryococcus brauni*, *Synechococcus nidulans* a *Arthrospira maxima*. U kvasinek byla sledována produkce karotenoidů, ergosterolu, koenzymu Q a lipidů v závislosti na teplotě, osmotickém stresu, světelném záření a absenci světelného záření. Pro řasové kultury byly zvolené obdobné stresové podmínky (osmotický, teplotní a světelný stres).

V první sérii kultivací kvasinkových kmenů byly provedeny kultivace s vlivem externího stresového faktoru, kde byly vyhodnoceny optimální podmínky, které by mohly být využitelné pro biotechnologickou produkci žádaných metabolitů. Téměř ve všech případech byla potvrzena skutečnost, že buď dochází k nadměrné produkci karotenoidů, nebo naopak lipidů, pravděpodobně kvůli kompetici o metabolický prekurzor, kterým je v obou případech acetyl-CoA.

Pro kmen *Rhodotorula glutinis* se jeví z hlediska produkce karotenoidů optimální teplota 15 °C a 25 °C, při osvětlení a u kontrolního média. Z hlediska výtěžnosti lipidů se jako neoptimálnější jeví kontrolní médium při 25 °C. U dalšího kmene *Rhodotorula mucilaginosa* pozorujeme obdobné optimum jako u výše uvedeného kmene stejného rodu. Dochází zde i k podobné výtěžnosti lipidů.

Kmen *Cystofilobasidium macerans* vykazoval velmi pozoruhodné výsledky. Jako neoptimálnější podmínky pro jeho růst se jeví nižší teplota (20 °C), než jako je tomu u rodu *Rhodotorula sp.*, a to při absenci světelného záření. Výsledek tohoto experimentu je velice zajímavý a měl by potenciální využití v budoucí biotechnologické produkci. Možností kultivace ve tmě se ušetří velké množství energie a tím se rapidně sníží i finanční zatížení procesu, které je tou největší překážkou pro uvedení do komerční produkce. Pokud se u tohoto kmene aplikovala zvýšená teplota (25 °C) a bylo mu omezeno světelné záření, kmen vykazoval vynikající míru nejenom akumulace lipidů (až 56 % biomasy), ale rovněž růstu kultury, díky němuž bylo dosaženo výtěžků lipidů až 5,3 g/l média. Tyto podmínky by se daly eventuelně využít pro produkci biopaliv, které by mohly být jako náhrada za naftu na bázi ropy. Ačkoliv jsou biopaliva na bázi rostlinných olejů snadno dostupné (paliva první generace), tak zasahují do potravinového řetězce a rovněž jsou závislé na environmentálních podmínkách. Díky tomu by lipidy z mikroorganismů mohly sloužit jako vhodná alternativa, poněvadž dokážou akumulovat vysoké množství lipidů o různém složení mastných kyselin.

Jako poslední kvasinkový kmen byl sledován *Sporidiobolus pararoseus*, u kterého docházelo k nejvyšším nárůstům biomasy při teplotě 20 °C, absenci světelného záření a v přítomnosti solného stresu až 2,0 mol/l NaCl (16,0 g/l). U produkce karotenoidů, jako induktor působila nízká teplota 10 °C při světle. Tento kmen vlivem externích stresových faktorů měnil aktivity svých biosyntetických drah a docházelo k různým optimům pro produkci ergosterolu, koenzymu Q a dalších lipofilních metabolitů. Výtěžnosti lipidů jsou srovnatelné s rodem *Rhodotorula sp.*

Vzhledem ke skutečnosti, že na řasy a sinice byly aplikovány podobné podmínky jako v případě kvasinkových kmenů, byly pozorovány výrazné inhibiční účinky. Solný stres byl aplikován na sladkovodní kmeny řas a sinic, které nebyly na tyto extrémní podmínky adaptované, a proto by bylo vhodné v budoucnu vyzkoušet experiment, kde se osmotický stres aplikuje na začátek nebo na konec exponenciální fáze. V našem případě docházelo i vlivem velmi nízkého osmotického stresu spíše k negativnímu efektu na produkci.

Výjimkou byl kmen *Arthrospira maxima*, kde solný stres indukoval růst kultury. Pro kmeny *Scenedesmus obliquus* a *Scenedesmus dimorphus* se jako optimální teplota pro produkci jeví 25 °C a 30 °C. Co se týče optimální intenzity osvětlení, tak rod *Scenedesmus* sp. preferoval spíše nižší intenzitu 200 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Rod *Chlorella* vykazoval velmi zajímavé výsledky. U kmene *Chlorella sorokiniana* bylo optimum pozorováno spíše při vyšších teplotách kolem 30 °C, zatímco podobný kmen *Chlorella saccharophila* upřednostňoval spíše optimální teploty kolem 20 °C. Podobnost v rámci tohoto rodu byla pozorována při aplikaci různé intenzity světelného záření, kde oba kmeny vykazovaly stejnou tendenci. Z hlediska akumulace lipidů vykazoval kmen *Chlorella saccharophila* lepší předpoklady pro biotechnologickou produkci.

Co se týče komerčně známého kmene *Arthrospira maxima*, uváděného rovněž pod názvem Spirulina, tak docházelo k velmi vysokým výtěžkům hlavně karotenoidů a dalších lipofilních metabolitů. Akumulace lipidů v buňkách nebyla příliš významná. Ačkoliv externím stresem se dala akumulace metabolitů navýšit, docházelo celkově k rapidnímu snížení nárůstu biomasy. Pokud ale srovnáme jednotlivé kmeny, vzhledem k vysokým nárůstům biomasy se zvyšuje výtěžnost lipidů, i když se nejedná o vysokou akumulaci v sinicové biomase.

Dále byl prozkoumán kmen *Botryococcus brauni*, u kterého se bohužel v našem případě nepotvrdila přílišná akumulace lipidů. S vysokou pravděpodobností se jednalo o různé uhlovodíky, které nebyly v této práci analyzovány. Tento kmen by mohl být více prozkoumán v dalších pracích. Námi zjištěné optimum pro nárůst kultury představovalo 25 °C při intenzitě 200 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Jako poslední kmen byl prostudován *Synechococcus nidulans*, kde jako jeho optimální teplota byla zjištěna 30 °C, ale v případě aplikace světelného stresu nad 400 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ docházelo k letálním účinkům.

Dále byly provedeny pilotní experimenty kokultivace vybraných kvasinek a řas. Podle těchto experimentů některé kmeny vykazovaly pozitivní efekt na nárůst kvasinkové biomasy. Jako nejvhodnější kmen pro kultivace se zdá být *Scenedesmus dimorphus*.

Pokud srovnáme mikrořasy a karotenogenní kvasinky, kvasinky disponují schopností rychlého růstu biomasy a tím dochází k vysokým produkcím žádaných metabolitů, které by se eventuálně mohly v budoucnu využít pro široké spektrum aplikací. Mikrořasy naopak rostou ve srovnání s kvasinkami pomaleji (vyjma *Arthrospira maxima*), zčásti proto, že byly kultivovány za provzdušňování vzduchem neobohaceným o oxid uhličitý. Lze předpokládat, že jeho přidáním by se rychlost růstu zvýšila. Mikrořasy ale produkují rovněž celou škálu cenných látek. Největší výhodou pro mikrořasy a sinice je, že se jedná o autotrofní mikroorganismy, které disponují účinným fotosyntetickým aparátem a efektivně přeměňují sluneční energii na energii chemickou. Vzhledem k tomu, že produkce mikrořasové biomasy je z velké části ovlivněna okolními podmínkami, je nutné zjistit optimální podmínky. Hlavní překážkou ještě pořád zůstává finanční zatížení celé biotechnologické produkce.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. Kvasinky. Bratislava: SNTL.
- [2] SATYANARAYANA, T. a G. Kunze. *Yeast biotechnology: diversity and applications*. New York: Springer, [2009]. ISBN 978-1-4020-8292-4.
- [3] VODRÁŽKA, Z. Biochemie. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [4] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1982, 483 s.
- [5] ŠILHÁNKOVÁ, L. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Vyd. 3., opr. a dopl., nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [6] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. Taxonómia kvasinek a kvasinkovitých mikroorganizmov. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo Alfa, 1990. Edícia potravinárskej literatúry. ISBN 80-050-0644-6.
- [7] KURTZMAN, C. P. a J. W. FELL. *The yeasts: a taxonomic study*. 4th ed. New York: Elsevier, c2000. ISBN 978-044-4813-121
- [8] YOUNG, A. a G. LOWE. Carotenoids—Antioxidant Properties. *Antioxidants*. 2018, 7(2). DOI: 10.3390/antiox7020028. ISSN 2076-3921. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2076-3921/7/2/28>
- [9] BUX, F. a Ch. CHISTI. *Algae Biotechnology*. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. ISBN 978-3-319-79176-0.
- [10] LEE, Y. Algal Nutrition - Heterotrophic Carbon Nutrition. *Handbook of Microalgal Culture*. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2003, 116-124. DOI: 10.1002/9780470995280.ch7. ISBN: 9780470995280. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470995280.ch7>
- [11] MAGALHÃES, J. C. *Microalgae as a Source of Bioenergy: Products, Processes and Economics*. 1. Porto, Portugal: Bentham Science Publishers, 2017. ISBN 9781681085234.
- [12] MATA, T. M., MARTINS, A. a CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2010, 14(1), 217-232 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1016/j.rser.2009.07.020. ISSN 13640321. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032109001646>
- [13] PEDROCHE, F., G. CONTRAFATTO a A. MINELI. Algae, In *Biological Systematics. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK, 2007.
- [14] BARSANTI, L. a P. GUALTIERI. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Second edition. Boca Raton, [Florida], [2014]. ISBN 978-143-9867-327.
- [15] KIM, S. a K. CHOJNACKA, ed. *Marine Algae Extracts*. 2015-02-16. DOI: 10.1002/9783527679577.
- [16] RICHMOND, A. a Z. CHENG-WU. Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. outdoors. *Journal of Biotechnology* [online]. 2001, 85(3), 259-269 [cit. 2019-01-29]. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00353-9. ISSN 01681656. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165600003539>
- [17] DAVIS, R., A. ADEN a P. T. PIENKOS. Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. *Applied Energy*. 2011, 88(10), 3524-3531. DOI: 10.1016/j.apenergy.2011.04.018. ISSN 03062619. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306261911002406>
- [18] JASPARS, M. a F. FOLMER. *Sea Vegetables for Health*. University of Aberdeen: Department of Chemistry School of Natural and Computing Science, 2013, 1(1), 29.

- [19] MCHUGH, D. J. *A guide to the seaweed industry: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS*. 1. School of Chemistry, University College University of New South Wales and Australian Defence Force Academy, Canberra Australia: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2003. ISBN 92-5-104958-0
- [20] CABANELAS, I. T. D., S. S. I. MARQUES, C. O. DE SOUZA, J. I. DRUZIAN a I. A. NASCIMENTO. Botryococcus, what to do with it? Effect of nutrient concentration on biorefinery potential. *Algal Research*. 2015, 11, 43-49. DOI: 10.1016/j.algal.2015.05.009. ISSN:22119264.
Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926415001290>
- [21] RINNA, F., S. BUONO, I. T. D. CABANELAS, I. A. NASCIMENTO, G. SANSONE a C. M. A. BARONE. Wastewater treatment by microalgae can generate high quality biodiesel feedstock. *Journal of Water Process Engineering*. 2017, 18, 144-149. DOI: 10.1016/j.jwpe.2017.06.006. ISSN 22147144. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214714416306730>
- [22] BANERJEE, A., R. SHARMA, Y. CHISTI a U. C. BANERJEE. Botryococcus braunii: A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2008, 22(3), 245-279. DOI: 10.1080/07388550290789513. ISSN 0738-8551. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388550290789513>
- [23] DICKINSON, S., M. MIENTUS, D. FREY, A. AMINI-HAJIBASHI, S. OZTURK, F. SHAIKH, D. SENGUPTA a M. M. EL-HALWAGI. A review of biodiesel production from microalgae. *Clean Technologies and Environmental Policy*. 2017, 19(3), 637-668. DOI: 10.1007/s10098-016-1309-6. ISSN: 1618-954X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10098-016-1309-6>
- [24] GERKEN, H., Z. SUN a J. LIU, ed. *Recent Advances in Microalgal Biotechnology*. 2016. DOI: 10.4172/978-1-63278-066-9-67.
- [25] TRAN, N.H., J.R. BARTLETT, G.S.K. KANNANGARA, A.S. MILEV, H. VOLK a M.A. WILSON. Catalytic upgrading of biorefinery oil from micro-algae. *Fuel*. 2010, 89(2), 265-274. DOI: 10.1016/j.fuel.2009.08.015. ISSN 00162361. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016236109003767>
- [26] QIN J., Bio-Hydrocarbons from Algae: Impacts of Temperature, Light and Salinity on Algae Growth, Rural Industries Research and Development Corporation Report. Adelaide SA Australia. Barton ACT: RIRDC, 2005.
- [27] POSTEN, C. a S. FENG CHEN. *Microalgae Biotechnology*. 1. Springer, 2016. ISBN 978-3-319-23808-1.
- [28] BAR, E., M. RISE, M. VISHKAUTSAN a Shoshana (Malis) ARAD. Pigment and Structural Changes in Chlorella zofingiensis upon Light and Nitrogen Stress. *Journal of Plant Physiology*. 1995, 146(4), 527-534. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)82019-5. ISSN 01761617. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161711820195>
- [29] GERKEN, H. G., B. DONOHOE a E. P. KNOSHAUG. Enzymatic cell wall degradation of Chlorella vulgaris and other microalgae for biofuels production. *Planta*. 2013, 237(1), 239-253. DOI: 10.1007/s00425-012-1765-0. ISSN 0032-0935. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00425-012-1765-0>
- [30] GONCALVES, E. C., J. V. JOHNSON a B. RATHINASABAPATHI. Conversion of membrane lipid acyl groups to triacylglycerol and formation of lipid bodies upon nitrogen starvation in biofuel green algae Chlorella UTEX29. *Planta*. 2013, 238(5), 895-906. DOI: 10.1007/s00425-013-1946-5. ISSN 0032-0935. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00425-013-1946-5>

- [31] LLOYD, N. D. H., D. T. CANVIN a D. A. CULVER. Photosynthesis and Photorespiration in Algae. *PLANT PHYSIOLOGY*. 1977, 59(5), 936-940. DOI: 10.1104/pp.59.5.936. ISSN 0032-0889. Dostupné také z: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.59.5.936>
- [32] WINOKUR, M. Photosynthesis Relationships of Chlorella Species. *American Journal of Botany*. 1948, 35(4). DOI: 10.2307/2437949. ISSN 00029122. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.1537-2197.1948.tb05210.x>
- [33] MELIS, A. Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science*. 2009, 177(4), 272-280. DOI: 10.1016/j.plantsci.2009.06.005. ISSN 01689452. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945209001861>
- [34] *Utilization of Exogenous Inorganic Carbon Species in Photosynthesis by Chlorella pyrenoidosa*. American Society of Plant Biologists (ASPB), 1980, 65,(No. 5).
- [35] CHIU, S., Ch. KAO, Ch. CHEN, T. KUAN, S. ONG a C. LIN. Reduction of CO₂ by a high-density culture of Chlorella sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology*. 2008, 99(9), 3389-3396. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.08.013. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852407006384>
- [36] SAKAI, N, Y. SAKAMOTO, N. KISHIMOTO, M. CHIHARA a I. KARUBE. Chlorella strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO₂. *Energy Conversion and Management*. 1995, 36(6-9), 693-696. DOI: 10.1016/0196-8904(95)00100-R. ISSN 01968904. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/019689049500100R>
- [37] ILLMAN, A.M, A.H SCRAGG a S.W SHALES. Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, 27(8), 631-635. DOI: 10.1016/S0141-0229(00)00266-0. ISSN 01410229. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022900002660>
- [38] *Occurrence of genus Scenedesmus Mayen (Chlorophyceae) from East Nepal*. Nepalese Journal of Biosciences, 2013, 2013(3).
- [39] SAAD, A. a A. ATIA. Review on Freshwater Blue-Green Algae (Cyanobacteria): Occurrence, Classification and Toxicology. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 2014, 11(3), 1319-1325. DOI: 10.13005/bbra/1522. ISSN 0973-1245. Dostupné také z: <http://www.biotech-asia.org/absdoic.php?snoid=1522>
- [40] KIM, Y., J. JEON, M. S. KWAK, Gwang Hoon KIM, InSong KOH, Mina RHO a Qunfeng DONG. Photosynthetic functions of Synechococcus in the ocean microbiomes of diverse salinity and seasons. *PLOS ONE*. 2018, 13(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0190266. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0190266>
- [41] SAHOO, D. a J. SECKBACH, ed. *The Algae World*. 2015. DOI: 10.1007/978-94-017-7321-8.
- [42] HABIB A. a M. PARVIN. A REVIEW ON CULTURE, PRODUCTION AND USE OF SPIRULINA AS FOOD FOR HUMANS AND FEEDS FOR DOMESTIC ANIMALS AND FISH. *Bangladesh Agricultural University*. Rome: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2008, 1(1), 41.
- [43] MALDONADE, I. R., D. B. RODRIGUEZ-AMAYA a A. R. P. SCAMPARINI. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chemistry*. 2008, 107(1), 145-150. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.07.075. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607007716>
- [44] MATA-GÓMEZ, L., J. MONTAÑEZ, A. MÉNDEZ-ZAVALA a C. AGUILAR. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*. 2014, 13(1). DOI: 10.1186/1475-2859-13-12. ISSN 1475-2859. Dostupné také z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-13-12>

- [45] VANDAMME, E. J. a J. L. REVUELTA, ed. *Industrial biotechnology of vitamins, biopigments, and antioxidants*. Weinheim: Wiley-VCH, [2016]. ISBN 978-3-527-33734-7.
- [46] CHANDI, Gurpreet Kaur a Balmeet Singh GILL. Production and Characterization of Microbial Carotenoids as an Alternative to Synthetic Colors: a Review. *International Journal of Food Properties*. 2011, 16(3), 503-513. DOI: 10.1080/10942910903256956. ISSN 1094-2912.
Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10942910903256956>
- [47] BRITTON, G. a T. W. GOODWIN. *Carotenoid Chemistry and Biochemistry*. 1982. DOI: 10.1016/C2013-0-10173-0.
- [48] LE QUESNE, P. W. *Phytochemistry of Fruit and Vegetables* Edited by F. A. Tomás-Barberán and R. J. Robins. Oxford University Press: New York, 1997. xii 375 pp. ISBN 0-19-857790-7. *Journal of the American Chemical Society*. 1997, 119(48), 11723-11723. DOI: 10.1021/ja975568v. ISSN 0002-7863. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja975568v>
- [49] MOLINÉ, M., D. LIBKIND a M. VAN BROOCK. Production of Torularhodin, Torulene, and β -Carotene by Rhodotorula Yeasts. *Microbial Carotenoids From Fungi*. Totowa, NJ: Humana Press, 2012, 2012-5-19, 275-283. *Methods in Molecular Biology*. DOI: 10.1007/978-1-61779-918-1_19. ISBN 978-1-61779-917-4. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-918-1_19
- [50] HUSSEIN, G., U. SANKAWA a et al. Astaxanthin, a Carotenoid with Potential in Human Health and Nutrition. *J. Nat. Prod.* 2005, 69(3), 443–449. DOI: 10.1021/np050354+.
- [51] SCHROEDER, W. a E. JOHNSON. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J Biol Chem*. 1995, 270(270), 16597-16601.
- [52] ANDREWES, A. G. a M. P. STARR. (3R,3'R)-astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Phytochemistry*. 1976, 15(6), 1009-1011. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)84391-5. ISSN 00319422. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942200843915>
- [53] ECHAVARRIERASUN, C. a E. JOHNSON. Stimulation of astaxanthin formation in the yeast by the fungus. *FEMS Yeast Research*. 2004, 4(4-5), 511-519. DOI: 10.1016/S1567-1356(03)00177-6. ISSN 15671356. Dostupné také z: [https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1016/S1567-1356\(03\)00177-6](https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1016/S1567-1356(03)00177-6)
- [54] VOET D., J. G. VOETOVÁ. *Biochemie*. 1. české vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995, 1325 s. ISBN 80-85605-44-9.
- [55] COMBS, G. F. a J. P. MCCLUNG. *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. Fifth edition. Boston: Elsevier/AP, [2017]. ISBN 978-012-8029-657.
- [56] CASAGRANDE, D., P. H. WAIB a A. A. JORDÃO JÚNIOR. *Mechanisms of action and effects of the administration of Coenzyme Q10 on metabolic syndrome*. 2018, 13, 26-32. DOI: 10.1016/j.jnim.2018.08.002. ISSN 23523859. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S235238591830032X>
- [57] YAHIA, E. M. *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry and human health*. 2nd edition. Hoboken, NJ, 2018. ISBN 978-111-9157-977.
- [58] MIZOGUCHI, T., Y. KIMURA, T. YOSHITOMI a H. TAMIYAKI. The stereochemistry of chlorophyll-c3 from the haptophyte *Emiliania huxleyi*: The (132R)-enantiomers of chlorophylls-c are exclusively selected as the photosynthetically active pigments in chromophyte algae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2011, 1807(11), 1467-1473. DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.07.008. ISSN 00052728. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272811001745>
- [59] LARKUM, A. W.D. a M. KÜHL. Chlorophyll d: the puzzle resolved. *Trends in Plant Science*. 2005, 10(8), 355-357. DOI: 10.1016/j.tplants.2005.06.005. ISSN 13601385. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138505001494>

- [60] AIRS, R.L., B. TEMPERTON, C. SAMBLES, G. FARNHAM, S.C. SKILL a C.A. LLEWELLYN. Chlorophyll f and chlorophyll d are produced in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii* when cultured under natural light and near-infrared radiation. *FEBS Letters*. 2014, 588(20), 3770-3777. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.08.026. ISSN 00145793. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2014.08.026>
- [61] CHEN, M. a Y. LI. A cyanobacterium that contains chlorophyll f - a red-absorbing photopigment. *FEBS Letters*. 2012, 586(19), 3249-3254. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.06.045. ISSN 00145793. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2012.06.045>
- [62] LI, Y., Y. LIN, P. C. LOUGHLIN a M. CHEN. Optimization and effects of different culture conditions on growth of *Halomicronema hongdechloris* – a filamentous cyanobacterium containing chlorophyll f. *Frontiers in Plant Science*. 2014, 5. DOI: 10.3389/fpls.2014.00067. ISSN 1664-462X. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00067/abstract>
- [63] VON WETTSTEIN, D. Chlorophyll Biosynthesis. *THE PLANT CELL ONLINE*. 7(7), 1039-1057. DOI: 10.1105/tpc.7.7.1039. ISSN 10404651. Dostupné také z: <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.7.7.1039>
- [64] SABA, A. a A. OWAIS. *Biochemistry, Lipids*[online]. Binghamton University: StatPearls Publishing, 2019 [cit. 2019-04-19]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525952/>
- [65] SHIELDS-MENARD, S. A., M. AMIRSADEGHI, W. Todd FRENCH a R. BOOPATHY. A review on microbial lipids as a potential biofuel. *Bioresource Technology*. 2018, 259, 451-460. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.03.080. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085241830431>
- [66] HOLEČEK, M. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1562-7.
- [67] LIU, L., J. CHEN a et al. Enhanced single cell oil production by mixed culture of *Chlorella pyrenoidosa* and *Rhodotorula glutinis* using cassava bagasse hydrolysate as carbon source. *Bioresource Technology*. 2018, 255, 140-148. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.01.114. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852418301287>
- [68] MAGDOULI, S., S.K. BRAR a et al. Co-culture for lipid production. *Biomass and Bioenergy*. 2016, 92, 20-30. DOI: 10.1016/j.biombioe.2016.06.003. ISSN 09619534. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953416301957>
- [69] GOERS, L., P. FREEMONT a K. M. POLIZZI. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *Journal of The Royal Society Interface*. 2014, 2001, 11(96), 20140065-20140065. DOI: 10.1098/rsif.2014.0065. ISSN 1742-5689. Dostupné také z: <http://rsif.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsif.2014.0065>
- [70] WANG, R., Y. TIAN a et al. Enhanced microalgal biomass and lipid production via co-culture of *Scenedesmus obliquus* and *Candida tropicalis* in an autotrophic system. 2016, 91(5), 1387-1396. DOI: 10.1002/jctb.4735. ISSN 02682575. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.4735>
- [71] ZHANG, Z., G. GONG a et al. Synergistic effects of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for enhancement of biomass and lipid yields. *Bioresource Technology*. 2014, 164, 93-99. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.04.039. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852414005446>

- [72] CHEIRSILP, B., W. SUWANNARAT a et al. Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. *New Biotechnology*. 2011, 28(4), 362-368. DOI: 10.1016/j.nbt.2011.01.004. ISSN 18716784. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678411000094>
- [73] WALKER, G. M. *Yeast physiology and biotechnology*. New York: J. Wiley, c1998. ISBN 978-0471964469.
- [74] MALISORN, C. a W. SUNTORNSUK. Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresource Technology*. 2008, 99(7), 2281-2287. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.05.019. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852407004348>
- [75] Effect of temperature and light on the growth of algae species. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015, 50, 431-444. DOI: 10.1016/j.rser.2015.05.024. ISSN 13640321. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032115004839>
- [76] UGWU a et al. Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration, and temperature on the growth of *Chlorella sorokiniana*. *PHOTOSYNTHETICA*. 2007, 45(2), 309-310.
- [77] ZHU, L. D., Z. H. LI a et al. Strategies for Lipid Production Improvement in Microalgae as a Biodiesel Feedstock. *BioMed Research International*. 2016, 2016, 1-8. DOI: 10.1155/2016/8792548. ISSN 2314-6133. Dostupné také z: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/8792548/>
- [78] ZHU, L. D. a E. HILTUNEN. Application of livestock waste compost to cultivate microalgae for bioproducts production: A feasible framework. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016, 54, 1285-1290. DOI: 10.1016/j.rser.2015.10.093. ISSN 13640321. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032115011727>
- [79] REED, N. G. The History of Ultraviolet Germicidal Irradiation for Air Disinfection. *Public Health Reports*. 2010, 125(1), 15-27. DOI: 10.1177/003335491012500105. ISSN 0033-3549. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/003335491012500105>
- [80] KOMMAREDDY, A. a G. ANDERSON, Study of light requirements of a Photobioreactor. *North Central ASAE/CSAE Conference*. The Society for engineering in agricultural, food, and biological systems, 2004, , 2-10.
- [81] FOYER. Photosynthesis. *Cell Biology: A series of monographs*. New York: John Wiley, 1984, Vol 1.
- [82] WHITTON, B.A. a N.G. CARR. *The Biology of cyanobacteria*. 2. Oxford: Blackwell Scientific, 1982. ISBN 0632006951.
- [83] MANDOTRA, S.K., P. KUMAR a et al. Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities. *Bioresource Technology*. 2016, 201, 222-229. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.11.042. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852415015680>
- [84] YEESANG, Ch. a B. CHEIRSILP. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Bioresource Technology*. 2011, 102(3), 3034-3040. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.10.013. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085241001669X>
- [85] TROLLER, J. Methods to Measure Water Activity. *Journal of Food Protection*. 1983, Vol 46(No.2), 1-6.
- [86] HOHMANN, S. a et al. *Yeast stress responses*. 1. US: Springer US, 2003. ISBN 978-3-540-45611-7.
- [87] KACZOR, A. a M. BARANSKA. *Carotenoids: nutrition, analysis and technology*. Hoboken, New Jersey: Wiley/Blackwell, 2016. ISBN 978-1-118-62226-1.

- [88] MAROVA, I., E. BREIEROVA a et al. Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of carotenogenic yeasts. *Annals of Microbiology*. Brno, 2004, 54(1), 73-85.
- [89] MAROVA, I., M. CARNECKA a et al. Production of Carotenoid-/Ergosterol-Supplemented Biomass by Red Yeast *Rhodotorula glutinis* Grown Under External Stress. *Food Technol. Biotechnol.* 2009, 48(1), 56-61. ISSN 1330-9862.
- [90] DUAN, X. Salt-induced osmotic stress for lipid overproduction in batch culture of *Chlorella vulgaris*. *African Journal of Biotechnology*. 2012, 11(27). DOI: 10.5897/AJB11.3670. ISSN 16845315. Dostupné také z: [http://www.academicjournals.org/ajb/abstracts/abs2012/3Aprxxx/Duan et al.htm](http://www.academicjournals.org/ajb/abstracts/abs2012/3Aprxxx/Duan%20et%20al.htm)
- [91] CHURÁČEK, J. Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-030-0569-8.
- [92] ZÁRUBA, K. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.
- [93] SOMMER, L. Základy analytické chemie. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214- 1742-0.
- [94] PARMAR, A., N. K. SINGH a et al. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology*. 2011, 102(22), 10163-10172. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.08.030. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852411011187>
- [95] CHRISTIE, W.W. a J. HUTTON. Preparation of Ester Derivatives of Fatty Acids for Chromatographic Analysis. *Advances in Lipid Methodology*. 1993, (2), 69-111.
- [96] SZOTKOWSKI, M. Srovnání metabolické aktivity a potenciálního využití mikrořas a pigmentotvorných kvasinek. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 97 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..
- [97] MARINIČOVÁ, V. Využití karotenogenních kvasinek k produkci lipidických metabolitů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 53 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

PUFA – polynenasycené mastné kyseliny

MUFA – mononenasycené mastné kyseliny

SFA – nasycené mastné kyseliny

ALA – 5-aminolevulová kyselina

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

PDA – detektor diodového pole

FID – plamenově ionizační detektor

GC – plynová chromatografie

IPP – isopentenylpyrofosfát

DAMPP – dimethylallylpyrofosfát

GPP – geranylgeranylpyrofosfát

FPP – farnesylpyrofosfát

GGPP – geranylgeranylpyrofosfát

HMG-CoA – 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA

TAG – triacylglyceroly

MK – mastné kyseliny

ACP – acyl carrier protein

YPD – yeast extract-pepton-dextrose

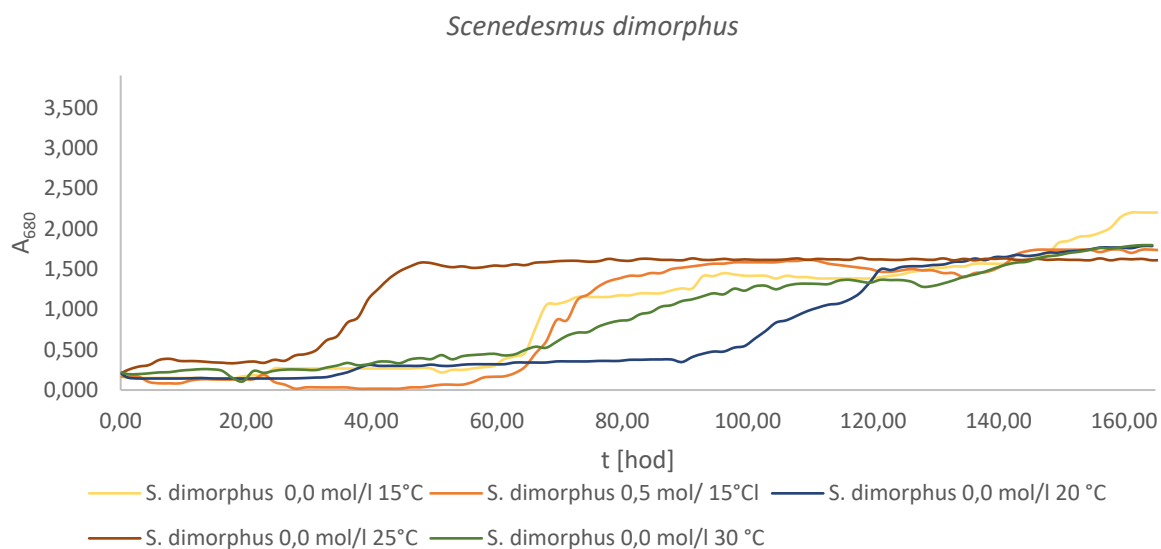
UV – ultrafialové záření

O – Osvětlení

T – Tma

9 PŘÍLOHY

Příloha 1. Grafická závislost absorpance (680 nm) kmene *Scenedesmus dimorphus* při různých teplotách



Příloha 2. Grafická závislost absorpance při (680 nm) kmene *Scenedesmus obliquus* při různých teplotách

